

高品質なRNAの回収のための糞便検体の保存およびRNA抽出方法

著者	石山 香穂里
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/00125307

修士論文

高品質な RNA の回収のための糞便検体の保存および RNA 抽出方法

東北大学大学院医学系研究科
病理病態学講座・微生物学分野

石山 香穂里

目次

1. 要約.....	1
2. 背景.....	2
3. 材料と方法.....	5
3.1 実験 1 イヌ糞便検体を用いた RNA 抽出キットの比較検討	5
3.1.1 糞便検体の採取と保存	5
3.1.2 糞便検体の前処理	5
3.1.3 RNA 抽出および DNase 処理	6
3.1.4 抽出した RNA の濃度および純度の測定	9
3.1.5 抽出した RNA の品質の評価	9
3.2 実験 2 RNeasy を用いて保存したイヌ糞便検体の RNA 抽出方法の検討.....	10
3.2.1 RNeasy を用いた糞便検体の採取と保存	11
3.2.2 RNeasy を用いて保存した糞便検体の前処理	11
3.2.3 RNA 抽出および DNase 処理	12
3.3 実験 3 FTA card に保存したイヌ糞便検体を用いた RNA 抽出キットの比較検討	12
3.3.1 FTA card を用いた糞便検体の採取と保存	12
3.3.2 FTA card を用いて保存した糞便検体の前処理	13
3.3.3 RNA 抽出および DNase 処理	14
3.4 実験 4 FTA card および RNeasy に保存したイヌ糞便検体内 RNA の比較.....	15
3.4.1 糞便検体の採取と保存	15
3.4.2 糞便検体の前処理	16
3.4.3 RNA 抽出および DNase 処理	16
3.5 実験 5 FTA card および RNeasy に保存したヒト糞便検体内 RNA の比較.....	16
3.5.1 糞便検体の採取と保存	16
3.5.2 糞便検体の前処理	17
3.5.3 RNA 抽出および DNase 処理	18

3.5.4	抽出した RNA の濃度および純度の測定	18
3.5.5	抽出した RNA の品質の測定	18
3.5.6	糞便検体から抽出した RNA におけるヒト由来 RNA の測定	19
3.6	統計解析	21
4.	結果.....	21
4.1	実験 1 イヌ糞便検体を用いた RNA 抽出キットの比較検討.....	21
4.1.1	抽出した RNA の濃度および純度	21
4.1.2	抽出した RNA の品質	22
4.2	実験 2 RNeasy を用いて保存したイヌ糞便検体の RNA 抽出方法の検討.....	22
4.2.1	抽出した RNA の濃度および純度	22
4.2.2	抽出した RNA の品質	23
4.3	実験 3 FTA card に保存したイヌ糞便検体を用いた RNA 抽出キットの比較検討	23
4.3.1	抽出した RNA の濃度および純度	23
4.3.2	抽出した RNA の品質	23
4.4	実験 4 FTA card 及び RNeasy に保存したイヌ糞便検体内 RNA の比較.....	24
4.4.1	抽出した RNA の濃度および純度	24
4.4.2	抽出した RNA の品質	24
4.5	実験 5 FTA card および RNeasy に保存したヒト糞便検体内 RNA の比較....	24
4.5.1	抽出した RNA の濃度および純度	24
4.5.2	抽出した RNA の品質	25
4.5.3	抽出した RNA 内におけるヒト由来 mRNA の存在	25
5.	考察.....	25
6.	結論.....	31
7.	謝辞.....	32

8. 参考文献.....	33
9. 图·表.....	36

1. 要約

臨床検体中の RNA は、急性胃腸炎などの原因病原体の検出や生体反応の評価等において用いられる。さらに近年の分子生物学的技術の発展により、不安定な分子構造を持つ RNA もゲノム解析技術が適用できるようになり、臨床検体内の RNA の分解を最小限にするための RNA の抽出方法および検体の保存方法の需要が高まっている。そこで本研究は、臨床検体の中でも夾雑物や RNase が存在する糞便検体から RNA 解析に耐え得る高い品質の RNA を抽出する事を目的として、イヌとヒトの糞便検体を用いた RNAlater と FTA card による保存方法および異なる特徴を持つ 4 種類の RNA 抽出キットを比較検討した。その結果、RNA 抽出キットの比較においては、糞便検体において MoBio が最も高純度かつ高い品質を保持した RNA が抽出可能であった。保存方法としては、FTA card を用いたイヌおよびヒト糞便検体の保存方法が検体内の RNA の分解を防ぎ、高い品質を保持した RNA の保存に最も優れていた。しかし、核酸安定化製品別の RNA 濃度の比較結果はイヌとヒトの検体で一致せず、ヒトの検体では低濃度の検体があったため、それらについては純度の評価も十分にできなかった。従ってヒトの糞便検体を用いる場合は、それ以降の実験や解析の進め方によって糞便検体の保存方法を使い分ける必要性が示唆された。糞便検体中の RNA を対象としたフィールド研究の発展には、既存の保存技術に加え、より濃度が高く、高い品質を確保することが可能な技術の開発が必要である。

2. 背景

リボ核酸（RNA）は、デオキシリボ核酸（DNA）およびタンパク質間の遺伝情報伝達の役割を果たしており、遺伝子の発現制御機構や遺伝子機能を探る上で有益な情報を提供する¹。RNAは、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、ウラシル（U）の4種類の塩基成分、リン酸基およびリボースという糖で構成されているが^{2,3}、このリボースは、DNAを構成する糖であるデオキシリボースに比べ、水酸基が1つ多いため、非常に化学反応の影響を受けやすく、分解されやすい不安定な核酸化合物である³。また、環境や試料中に存在するRNAの分解作用を持つリボヌクレアーゼ（RNase）は、非常に安定なタンパク質であり、失活されにくい⁴。以上のことより高い品質かつ純度のRNAを保つことは容易では無いが、RNAを対象とした解析においてRNAの品質および純度は、重要な因子であり、RNA解析の信頼性と再現性に影響を及ぼす⁵。そのため、検査や実験で取り扱う臨床検体内のRNAを高純度で抽出する方法や、RNAの分解を最小限にするため一般的には-20℃や-80℃での臨床検体の保存や液体窒素による保存、安定化させるための試薬を添加するなどの注意を要する⁶。近年、次世代シーケンサーの導入を始めとする分子生物学的技術の発展により、ゲノム解析技術が飛躍的に進歩し、RNAシーケンスによるトランスクリプトーム解析やマイクロアレイ解析などが盛んに行われるようになった。これまで、ヒト宿主側の転写産物の発現量の差異は、細菌性感染症とウイルス性感染症の鑑別診断に有用である可能性⁷や細菌の転写産物の発現量の変遷は、細菌の抗菌薬耐性の予測に有用である⁸ことが明らかになっている。また、ウイルス感染症においては、トランスクリプトーム解析を用いた免疫学的メカニズムの解明も行われている⁹。

一方、原因病原体の検出においてもRNA解析は重要である。病原体の中でもRNAウイルスは、DNAウイルスと比べ遺伝子の安定性が低いためウイルスゲノムの多様性が高く、抗原変異株の流行が問題視されている^{10,11}。そのため、より長い遺伝子領域のウイルス遺伝子の解析は、抗原変異株発生の進化過程を明らかにするために欠かせない手法であり、次世代シーケンサーを用いて病原体ゲノムの全長を解析する技術も広く使われるようになった。また、急性胃腸炎の起因ウイルスの中でも最も重要なウイルスであるノロウイルスやサポウイルスなど培養系が確立していないウイルスでは、糞便検体におけるウイルス遺伝子診断が主な診

断手段であるため¹²、糞便検体内での RNA の保存状態は診断検査の感度に影響を与えることになる。

このように臨床検体からヒトの RNA や RNA ウイルスを検出する技術や、RNA を含んだ糞便検体を採取し、検査や実験のために保存する方法やより効率的に質の高い RNA を抽出する方法の需要が高まっている^{6,13}。

しかし、臨床研究や遠隔地でのフィールド研究におけるヒトの糞便検体の採取後の取り扱いにおいては、安定性が低い RNA の質を保つことが可能でかつ臨床現場やフィールドにおいて実行可能な比較的簡便な方法が必要である。例えば、排便後からの経過時間、核酸安定化製品や温度によって腸内細菌の構成が実際の構成と解析結果で異なり、メタトランスクリプトーム解析結果の信憑性を疑問視する報告もある⁶。

一般に臨床研究やフィールド研究において採取されたヒトの糞便検体は、一時的にクーラーボックスや手近な冷蔵庫や冷凍庫に保管され、研究室にてより低温を保つ冷凍庫や液体窒素内で凍結保存される。検体を凍結保存するために頻繁に検体を研究室に持ち帰ることや、フィールドへ液体窒素のタンク等を持ち運びながら検体を採取することは労力や費用がかかる。これは、資源の乏しい低中所得国での研究やサーベイランスにおいて大きな課題である。さらに、検体を採取している研究サイトから実験施設への検体輸送の点においても、より安全で安価かつ試料の質を落とさない輸送方法が必要である。

加えて、夾雑物を多く含む糞便検体から抽出した RNA は、純度が十分では無いことや、試料内に含まれる RNA の分解作用を持つ RNase の影響を受けることから糞便検体からの RNA の検出や定量は慎重に行う必要がある。しかし、近年大腸ガン患者の糞便中の RNA を用いた疾病診断の有用性を指摘する論文^{14,15}も発表されており、上述したような糞便検体中の RNA の問題点を克服する事が可能となれば、糞便検体は、侵襲の少ない有用な生体試料となり得る可能性がある。

一方、RNA の抽出方法においては、現在まで有機溶媒を用いた抽出方法が検体の種類に関わらず最も広く使用されてきた。この方法は、高濃度の RNA の抽出が可能であるが、抽出された RNA には塩やアルコールなどの有機化合物の残留が認められ、RNA の純度が低く、断片化されやすいという問題点があった¹⁶。そのため、近年高濃度かつ高純度の RNA の抽出を重

視した RNA 抽出キットが多く販売されており、糞便検体に特化した RNA 抽出キットでは、RNase や夾雑物の除去作用を強化することで、以前と比べ糞便検体から高濃度かつ高純度な高い質を保持した RNA の抽出は可能となりつつある。また、RNA の高い品質（Integrity：本論文上で扱う RNA の品質については、後述する“3.1.5 抽出した RNA の品質の評価”で述べる。）の保持には、糞便検体を採取後直ぐに液体窒素内や冷凍庫内で保存する方法が推奨されているが、フィールド研究を始めこのような方法は実用的ではない。そのため、RNA の安定化を実現するために複数の核酸安定化製品が使用されている。核酸安定化試薬は、検体に加えて保存するだけで RNA の安定化が実現可能であることから様々な種類の検体の保存に広く使用されてきた。しかし室温での長時間の検体保存には適していない^{6,17,18}。Reck らはフィールド研究への適用を前提とした上で、4 種類の核酸安定化試薬が与える抽出された RNA への影響を比較検討した⁶。核酸安定化試薬の比較により、RNAlater は最も効率的に mRNA の高い品質の保存が可能であったが、核酸安定化試薬内に保存された検体から抽出した RNA を用いた転写産物には、小規模ながら変異が導入されていた事を報告している⁶。このような核酸安定化試薬内に保存された検体から抽出した核酸に導入された変異についての報告は、Reck らの研究以外においても報告されている^{19,20}。Reck らが比較した 4 種類の核酸安定化製品は、全て液体状の核酸安定化試薬であった。そこで私は、Reck らの研究には用いられていなかった、血液検体採取の用途として主に使用されている濾紙状の核酸安定化製品を用いた糞便検体の採取方法について検討することは、意義があるのではないかと考えた。濾紙状の核酸安定化製品は、室温において検体の長期保存が可能であり²¹、輸送の際も -20 °C や -80 °C での温度管理の必要がなく、軽量であるためフィールド研究における糞便検体の採取に使用しやすい。しかし、私の知る限り濾紙状の核酸安定化製品を使用した糞便検体の採取および RNA の抽出について比較検討を行なった研究は少ない。

以上を踏まえて本研究は、糞便検体から RNA 解析に耐え得る高い質の RNA を抽出することを目的として、糞便検体の保存方法および RNA 抽出キットを比較検討することとした。実際にフィールド研究で採取した糞便検体を濾紙状の核酸安定化製品および核酸安定化試薬の 2 種類の核酸安定化製品を使用して保存し、4 種類の RNA 抽出キットで抽出した RNA の濃度、純度および RNA の品質を比較検討した [図 1]。

3. 材料と方法

3.1 実験1 イヌ糞便検体を用いた RNA 抽出キットの比較検討

イヌの糞便検体を採取し、4 種類の RNA 抽出キットを用いて抽出した RNA の濃度、純度および品質を比較検討した。検体の種類に関わらず最も広く使用されている核酸抽出方法である、フェノール・クロロホルム抽出方法を使用した製品の一つで生体液試料に適した TRIzol LS Reagent (TRIzol) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA)、糞便検体などの夾雑物や RNase を含む試料に特化した RNeasy PowerMicrobiome Kit (MoBio) (QIAGEN, Hilden, Germany)、核酸吸着性の磁性ビーズを用いた MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Kit (MagMAX) (Applied Biosystems, Foster, California, USA)、2 種類のカラムを搭載し、検体内のゲノム DNA の除去が可能な Quick-RNA Miniprep Kit (Zymo) (Zymo Research, Irvine, California, USA)、これらの異なる特徴を持つ 4 種類の RNA 抽出キット [表 1] を使用し、抽出した RNA の濃度および純度、品質を比較検討することで、糞便検体に最も適した RNA 抽出キットを明らかにした。

3.1.1 糞便検体の採取と保存

一頭のイヌより排便後 30 分以内に採取した糞便は、50 mL コニカル遠心チューブ (Nest Scientific USA, Rahway, New Jersey, USA) 内に入れ、よく混合した。その後混合した糞便検体は、2.0 mL マイクロチューブ (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany) 内に等分し、4 時間以内に -80°C で凍結保存した。その後、各 RNA 抽出キットにつき 5 標本を下述の方法で即日 RNA の抽出を行なった。また、糞便検体の代わりに各 RNA 抽出キットで用いた RNA の溶出緩衝液を添加した陰性コントロール (NC) を作成した。

3.1.2 糞便検体の前処理

TRIzol および Zymo は、RNA 抽出前に糞便検体の前処理を行い、RNA 抽出のための糞便成分を抽出した。

3.1.2.1 TRIzol を用いた RNA 抽出のための糞便検体の前処理

-80 °Cに保存した糞便検体を 4 °Cで 1 時間融解し、0.25 g を計り取り、1 × PBS(-) 1mL を予め添加した 2 mL マイクロチューブ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) 内に添加した。高速振盪機 (東京理化器械株式会社, 東京, 日本) で 3 分間攪拌後、遠心分離機 (株式会社トミー精工, 東京, 日本) で 100 × g 1 分間の遠心後、上清を得た。

3.1.2.2 Zymo を用いた RNA 抽出のための糞便検体の前処理

4 °Cで 1 時間融解した糞便検体から 0.25 g の糞便を計り取り、キット付属の RNA Lysis Buffer 730 µL を予め添加した SK38 Soil Grinding Lysis Bead Tubes (Bertin corp, Rockville, Maryland, USA) 内に添加した。その後 Vortex Adapter for 24 (1.5—2.0 mL) tubes (QIAGEN, Hilden, Germany) を装着したボルテックスミキサー (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA) で 5 分間反応させた。遠心分離機で 13 000 × g 2 分間遠心した後、室温で 5 分間静置した。

3.1.3 RNA 抽出および DNase 処理

3.1.3.1 TRIzol を用いた RNA 抽出

糞便検体の前処理により得られた上清 250 µL を新たな 1.5 mL ポリプロピレンチューブ (ビーエム機器株式会社, 東京, 日本) に移し、TRIzol 750 µL を添加した。よく混合後、室温で 10 分間反応させた。さらにクロロホルム (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) 200 µL を添加し、転倒混和した。遠心分離機で 12 000 × g 5 分間遠心後、RNA が含まれた上清をイソプロパノール (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) 500 µL を予め添加した 1.5 mL ポリプロピレンチューブに添加し、転倒混和した。室温で 10 分間静置後、遠心分離機で 12 000 × g 10 分間遠心し、上清を全て取り除いた。得られた RNA 沈殿物に 75 % エタノール 1 mL を加え、遠心分離機で 12 000 × g 1 分間遠心後、上清を全て取り除き、塩の洗浄を行った。この洗浄操作を 2 回行い、RNA 沈殿物を遠心分離機で 12 000 × g 1

分間遠心後、上清を丁寧に取り除いた。RNA 沈殿物は、室温で 2 分間乾燥した後、UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) 50 μ L 内で溶解した。

3.1.3.2 MoBio を用いた RNA 抽出

4 $^{\circ}$ C で 1 時間融解した糞便検体は、MoBio を用いて、キット添付のプロトコールに従い RNA 抽出および DNase 処理を行った。まず 0.25 g の糞便を計り取り、キット付属のビーズチューブに加えた。さらに 55 $^{\circ}$ C に予め温めた Solution PM 1 650 μ L と 2-メルカプトエタノール (SIGMA-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 6.5 μ L を添加し、Vortex Adapter for 24 (1.5—2.0 mL) tubes を装着したボルテックスミキサーで 10 分間攪拌後、遠心分離機で 13 000 \times g にて 1 分間遠心した。その後、Inhibitor removal solution (阻害剤除去溶液) である Solution IRS 150 μ L を添加し、混合した後 4 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた。これを遠心分離機で 13 000 \times g にて 1 分間遠心し、不純物や夾雑物を沈殿させた後、上清 600 μ L をキット付属の 2.0 mL コレクションチューブに移し、Solution PM3 650 μ L および Solution PM4 650 μ L を加え混合した。その後、反応液 650 μ L ずつをスピンドフィルターに加え、遠心分離機で 13 000 \times g にて 1 分間遠心し、核酸をスピンドフィルターに吸着させた。この吸着操作を反応液が無くなるまで行った。その後、Solution PM5 650 μ L をスピンドフィルターに添加し、遠心分離機で 13 000 \times g にて 1 分間遠心した。さらに再度遠心分離機で 13 000 \times g にて 1 分間遠心し、洗浄液の残留を完全に取り除いた。新たな 2.0 mL コレクションチューブに設置したスピンドフィルターに、1 検体につき Solution PM6 45 μ L および DNase I Solution 5 μ L で構成された DNase I Solution 50 μ L を添加後、室温で 15 分間反応させ、DNase 処理を行った。反応後、Solution PM7 400 μ L を添加し、遠心分離機で 13 000 \times g にて 1 分間遠心した。さらに Solution PM5 650 μ L を添加し、遠心分離機で 13 000 \times g にて 1 分間遠心後、Solution PM4 650 μ L を添加し、遠心分離機で 13 000 \times g にて 1 分間遠心し、塩の洗浄を行った。その後、遠心分離機で 13 000 \times g にて 2 分間遠心し、洗浄液の残留を完全に取り除いた。その後、スピンドフィルターは新たな 2.0 mL コレクションチューブに設置し、RNase-Free Water 100 μ L で RNA を溶解した。

3.1.3.3 MagMAX を用いた RNA 抽出

4 °C で 1 時間融解した糞便検体は、MagMAX を用いて、キット添付のプロトコールに従い RNA 抽出を行った。まず 0.3 g の糞便を計り取り、1 × PBS(-) 1 mL が予め添加された 2 mL マイクロチューブに添加し、高速振盪機で 3 分間攪拌後、遠心分離機で 100 × g にて 1 分間遠心した。上清 175 µL を Lysis/Binding Solution Concentrate 235 µL が予め添加されたキット付属のビーズチューブに添加し、高速振盪機で 15 分間攪拌した。遠心分離機で 16 000 × g にて 3 分間遠心後、得られた上清 300 µL を新たな 1.5 mL マイクロチューブ（アズワン株式会社，大阪，日本）に添加し、遠心分離機で 16 000 × g にて 6 分間遠心した。得られた上清 115 µL を予め 100 % イソプロパノール 65 µL が添加された 1.5 mL マイクロチューブに加え、高速振盪機で 1 分間攪拌した。さらに 1 検体につき NA Binding Beads 10 µL および Lysis/Binding Enhancer 10 µL で構成された Bead Mix 20 µL を加え、高速振盪機で 5 分間攪拌した後、磁気スタンドに 5 分間静置し、核酸が吸着した NA Binding Beads を捕集した。上清を取り除いた後、Wash Solution 1 150 µL を加え、高速振盪機で 1 分間攪拌し洗浄後、磁気スタンドに 1 分間静置し、NA Binding Beads を捕集した。この洗浄操作を再度繰り返した。上清を取り除いた後、Wash Solution 2 150 µL を加え、高速振盪機で 1 分間攪拌し洗浄後、磁気スタンドに 1 分間静置し、NA Binding Beads を捕集した。この洗浄操作を再度繰り返した。その後、NA Binding Beads を高速振盪機で 2 分間の攪拌により乾燥させ、予め 65 °C に保温した Elution Buffer 50 µL を加え、高速振盪機で 3 分間の攪拌により NA Binding Beads と核酸を分離した。その後、磁気スタンドに 1 分間静置し、NA Binding Beads を捕集し、上清より RNA を得た。

3.1.3.4 Zymo を用いた RNA 抽出

前処理を行った糞便検体は、Zymo を用いて、キット添付のプロトコールに従い RNA 抽出および DNase 処理を行った。まず前処理を行った糞便検体の上清をコレクションチューブに設置された Spin-Away Filter (yellow) に添加し、遠心分離機で 13 000 × g にて 1 分間遠心し、ゲノム DNA を取り除いた。Spin-Away Filter から得られた濾過液をコレクションチュー

ブに設置された Zymo-Spin III CG Column (green) に添加し、遠心分離機で $13\,000 \times g$ にて 1 分間遠心した。その後、RNA Wash Buffer 400 μL をカラムに添加し、遠心分離機で $13\,000 \times g$ にて 1 分間遠心した。1 検体につき DNase I 5 μL および DNase Digestion Buffer 75 μL で構成された DNase I Reaction Mix 80 μL をカラムに添加し、室温で 15 分間反応させ、DNase 処理を行った。遠心分離機で $13\,000 \times g$ にて 1 分間遠心した後、RNA Prep Buffer 400 μL をカラムに添加し、遠心分離機で $13\,000 \times g$ にて 1 分間遠心した。その後、RNA Wash Buffer 700 μL をカラムに添加し、遠心分離機で $13\,000 \times g$ にて 1 分間遠心した。さらに、RNA Wash Buffer 400 μL をカラムに添加し、遠心分離機で $13\,000 \times g$ にて 2 分間遠心し、洗浄液の残留を完全に取り除いた。その後 RNA は、キット付属の DNase/RNase-Free Water 100 μL で溶解した。

3.1.4 抽出した RNA の濃度および純度の測定

抽出した RNA の濃度は、Qubit RNA BR Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) を用いて Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) で測定した。各 RNA 抽出キットのプロトコールによって用いた糞便検体量および RNA 溶出のための溶出液量がそれぞれ異なるため、RNA 抽出に用いた糞便検体量を 0.25 g、RNA 溶出のための溶出液量を 100 μL に合わせて補正し、標準化した。その後抽出した RNA の純度は、NanoDrop One 超微量紫外可視分光光度計 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) を用いて測定した。RNA の純度評価には、230 nm、260 nm と 280 nm の吸光度から算出される吸光度比が用いられ、一般的に 2.0 付近の A260/A280 比は、タンパク質の混入が少ないことを示し、2.0 付近の A260/A230 比は、塩やアルコールなどの有機化合物の残留が少ないことを示す⁴。本研究では、2.0 以上を示す A260/A280 比および A260/A230 比を保持した RNA を高純度な RNA と評価した。

3.1.5 抽出した RNA の品質の評価

抽出した RNA の品質は、環境や試料中に存在する RNase などによる RNA の分解の程度を最高値 10 を最も品質が高いとした連続変数で分類する RNA の品質の指標である RIN (RNA

Integrity Number) という RNA の品質の指標²²を用いて評価した。イルミナ社の RNA シークエンス解析には $RIN = 8$ 以上²³、RNA から合成した相補的 DNA を使用した DNA マイクロアレイ解析には、 $RIN = 6$ 以上が推奨されている²⁴。一方で強く分解されてしまった RNA は、 $RIN = 3$ を示し²⁵、完全に分解されてしまった RNA は、 $RIN = 1$ を示す²²。また、電気泳動において 2 種類の 18S リボソーム RNA (rRNA) および 28S rRNA のバンドがヒト細胞株 (HEp-2) 由来の RNA の陽性コントロールと比較して同じ位置に確認出来るかどうかを確認した。

3.1.5.1 RIN の測定

RIN は、Agilent RNA 6000 ナノキット (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) を用いて Agilent 2100 バイオアナライザー (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) で、キット添付のプロトコールに従い、測定した。

3.1.5.2 電気泳動

0.5 × Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer を加えた電気泳動装置 (株式会社ミューピッド, 東京, 日本) で 100 V 30 分間電気泳動を行った。0.5 × TBE Buffer に 1 % エチジウムブロマイド (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を添加した 1 % UltraPure Agarose (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) を溶解し作成したゲルを設置後、抽出した RNA 2 μ L および 2 × Loading Dye (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) の混合物をウェルに注入し、泳動後のバンドの位置に基づく分子量の指標として、1 kb DNA Ladder (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) および 2 × Loading Dye (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) の混合物をウェルに注入した。さらに、各 RNA 抽出キット内に汚染が無い事を証明する陰性コントロール (NC) 、18S rRNA および 28S rRNA の 2 種類のバンドの位置が確認できるように陽性コントロール (PC1 ・ PC2) としヒト由来の細胞株 (HEp-2) から抽出した RNA を用いた。

3.2 実験 2 RNAlater を用いて保存したイヌ糞便検体の RNA 抽出方法の検討

RNAlater Stabilization Solution (RNAlater) (Ambion, Austin, Texas, USA) は、核酸

を安定化させる液体試薬の一種であり、検体を RNAlater に加えて保存するだけで RNA の安定化が実現可能であることから様々な種類の検体の保存に広く使用されている^{6,26}。しかし糞便検体保存における RNAlater の使用方法は確立されておらず、様々な方法が用いられている^{6,27}。そこで本研究では、RNAlater を用いて保存したイヌの糞便検体の上清および沈殿物でどちらがより高濃度、高純度および高い品質を保持した RNA を抽出可能かどうか比較検討した。また、糞便検体保存時の RNAlater による糞便検体の希釈倍率も確立されておらず、様々な希釈倍率を使用されている^{27,28}。そこで RNAlater を用いて糞便検体を保存する際に、糞便検体に対して 1 倍量および 3 倍量の RNAlater を加えて保存したイヌの糞便検体の沈殿物から抽出した RNA の濃度、純度および RNA の品質を比較検討し、糞便検体を用いた RNA 抽出に有用な糞便検体の希釈倍率を明らかにした。

3.2.1 RNAlater を用いた糞便検体の採取と保存

排便後 30 分以内に採取した約 2 g の糞便検体をおおよそ 1 倍量にあたる RNAlater 2 mL を予め添加した 15 mL コニカル遠心チューブ (Nest Scientific USA, Rahway, New Jersey, USA) および、約 2 g の糞便検体に対して 3 倍量の RNAlater 6 mL を予め添加した 15 mL コニカル遠心チューブにそれぞれ採取した。チューブ内で糞便検体を十分に混和し、約 4 °C に冷却したクーラーボックス内に一時的に保存し、2 時間以内に -80 °C で凍結保存した。1 倍量の RNAlater を加えて保存したイヌの糞便沈殿物、3 倍量の RNAlater を加えて保存したイヌの糞便沈殿物および 3 倍量の RNAlater を加えて保存したイヌの糞便検体の上清につき 5 標本ずつを RNA 抽出に用いた。糞便検体に対して 1 倍量の RNAlater を加えて保存した糞便検体は、即日 RNA 抽出を行ない、糞便検体に対して 3 倍量の RNAlater を加えて保存した糞便検体は、1 ヶ月以内に RNA 抽出を行なった。また、糞便検体の代わりに MoBio 付属の RNase-Free Water を添加した陰性コントロール (NC) を作成した。

3.2.2 RNAlater を用いて保存した糞便検体の前処理

RNAlater を加え各希釈倍率に保存した糞便検体を融解し、遠心分離機で 15 000 × rpm 1 分間遠心した。糞便検体に対して 3 倍量の RNAlater を加えて保存した糞便検体は上清 250

μL を取り、さらに糞便沈殿物 0.25 g を計り取り、それぞれ MoBio 付属のビーズチューブに加えた。糞便検体に対して 1 倍量の RNeasy を加えて保存した糞便検体は全上清を取り除き、糞便沈殿物から 0.25 g を計り取り、MoBio 付属のビーズチューブに加えた。遠心後の糞便検体に対して 1 倍量の RNeasy を加えて保存された糞便検体からは、RNA 抽出に十分な量の上清が得られなかったため、RNA 抽出を行うことができなかった。

3.2.3 RNA 抽出および DNase 処理

前処理を行った糞便検体から MoBio を用いて、キット添付のプロトコールに従い RNA を抽出し、溶出液に混入した DNA を取り除くため、DNase 処理を行った。その後抽出した RNA の濃度および純度、品質の測定は、先述の 3.1.4 抽出した RNA の濃度および純度の測定から 3.1.5 抽出した RNA の品質の評価と同様の手順で行った。

3.3 実験 3 FTA card に保存したイヌ糞便検体を用いた RNA 抽出キットの比較検討

方法 3.1 における核酸安定化製品を使用せずに保存した検体を用いた RNA 抽出キットの比較検討実験で抽出した RNA はほとんど分解されており、抽出された RNA の品質を RNA 抽出キット間で比較できなかった。そこで、濾紙状の核酸安定化製品の一種である FTA Classic Card (FTA card) (GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) [図 2] を用いて保存した糞便検体を使用し、TRIzol、MoBio、MagMAX、Zymo、これらの異なる特徴を持つ 4 種類の RNA 抽出キットで RNA の抽出を行った。抽出した RNA の濃度、純度および RNA の品質を比較検討し、糞便検体を用いた RNA の抽出に有用な RNA 抽出キットを明らかにした。

3.3.1 FTA card を用いた糞便検体の採取と保存

排便後 30 分以内に採取したイヌの糞便検体を各 RNA 抽出キットにつき 5 標本ずつ FTA card を用いて採取し、保存した。約 0.1 g のイヌの糞便検体は、FTA card 上の 4 つのサンプルエリアに均一に塗布し、室温で 1 時間乾燥させた。乾燥後は、室温にて研究室に運ばれ、研究室にて 2 時間以内に 4 °C で保存した。その後、下述の方法で即日 RNA の抽出を行

なった。また、糞便検体の代わりに MoBio 付属の RNase-Free Water を添加した第一陰性コントロール (NC1)、糞便検体の代わりに何も塗布していない FTA card を添加した第二陰性コントロール (NC2) を作成した。

3.3.2 FTA card を用いて保存した糞便検体の前処理

各 RNA 抽出キットの前処理方法に従い、FTA card から糞便成分を抽出した。

3.3.2.1 TRIzol を用いた RNA 抽出のための FTA card に塗布された糞便検体の前処理

FTA card に塗布し保存された糞便検体は、4 つのサンプルエリアのうち 2 つをカッターで切り取り、1.5 mL マイクロチューブ内に入れた。1 × PBS(-) 500 μ L を添加後、Vortex Adapter for 24 (1.5—2.0 mL) tubes を装着したボルテックスミキサーで 10 分間反応させた。遠心分離機で 13 000 × g 1 分間遠心後、5 mL シリンジ (テルモ株式会社, 東京, 日本) 内に上清と FTA card を加え、液体成分を 1.5 mL マイクロチューブ内に押し出した。

3.3.2.2 MoBio を用いた RNA 抽出のための FTA card に塗布された糞便検体の前処理

FTA card に塗布し保存された糞便検体は、4 つのサンプルエリアのうち 2 つをカッターで切り取り、1.5 mL マイクロチューブ内に入れた。予め 55 °C に保温した MoBio 付属の Solution PM1 650 μ L と 2-メルカプトエタノール 6.5 μ L を 1.5 mL マイクロチューブに添加し、Vortex Adapter for 24 (1.5—2.0 mL) tubes を装着したボルテックスミキサーで 10 分間攪拌後、遠心分離機で 13 000 × g にて 1 分間遠心した。5 mL シリンジ内に上清と FTA card を加え、液体成分を MoBio 付属のビーズチューブ内に押し出した。

3.3.2.3 MagMAX を用いた RNA 抽出のための FTA card に塗布された糞便検体の前処理

FTA card に塗布し保存された糞便検体は、4 つのサンプルエリアのうち 2 つをカッターで切り取り、2 mL マイクロチューブ内に入れた。1 × PBS(-) 1 mL を添加後、高速振盪機で 3 分間攪拌させた。遠心分離機で 100 × g 1 分間遠心後、5 mL シリンジ内に上清と FTA card を加え、液体成分を 2 mL マイクロチューブ内に押し出した。

3.3.2.4 Zymo を用いた RNA 抽出のための FTA card に塗布された糞便検体の前処理

FTA card 内に保存された糞便検体は、4 つのサンプルエリアのうち 2 つをカッターで切り取り、1.5 mL マイクロチューブ内に入れた。キット付属の RNA Lysis Buffer 750 μ L を添加後、Vortex Adapter for 24 (1.5—2.0 mL) tubes を装着したボルテックスミキサーで 10 分間反応させた。室温で 5 分間静置後、遠心分離機で 13 000 \times g 1 分間遠心した。5 mL シリンジ内に上清と FTA card を加え、液体成分を 1.5 mL マイクロチューブ内に押し出した。

3.3.3 RNA 抽出および DNase 処理

3.3.3.1 TRIzol を用いた RNA 抽出

前処理を行った糞便検体は、先述の 3.1.3.1 TRIzol を用いた RNA 抽出と同様な手順で RNA 抽出を行なった。その後抽出された RNA は、UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water 50 μ L で溶解した。さらに抽出された RNA は、TURBO DNA-free Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) を用いて、キット添付のプロトコールに従い DNase 処理を行った。

3.3.3.2 MoBio を用いた RNA 抽出

前処理を行った糞便検体は、先述の 3.1.3.2 MoBio を用いた RNA 抽出と同様な手順で RNA 抽出および DNase 処理を行った。その後抽出された RNA は、UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water 100 μ L で溶解した。

3.3.3.3 MagMAX を用いた RNA 抽出

各前処理を行った糞便検体は、先述の 3.1.3.3 MagMAX を用いた RNA 抽出と同様な手順で RNA 抽出を行った。抽出された RNA は、予め 65 $^{\circ}$ C に保温したキット付属の Elution Buffer 50 μ L で溶解した。その後、TURBO DNA-free Kit を用いて、キット添付のプロトコールに従い DNase 処理を行った。

3.3.3.4 Zymo を用いた RNA 抽出

各前処理を行った糞便検体は、先述の 3.1.3.4 Zymo を用いた RNA 抽出と同様な手順で RNA 抽出および DNase 処理を行った。抽出された RNA は UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water 100 μ L で溶解した。その後抽出した RNA の濃度および純度、品質の測定は、先述の 3.1.4 抽出した RNA の濃度および純度の測定から 3.1.5 抽出した RNA の品質の評価と同様の手順で行った。

3.4 実験 4 FTA card および RNAlater に保存したイヌ糞便検体内 RNA の比較

FTA card および RNAlater の 2 種類の核酸安定化製品を用いて保存されたイヌの糞便検体を使用し、抽出した RNA の濃度、純度および RNA の品質を比較検討し、糞便検体を用いた RNA 抽出に有用な糞便検体の保存方法を明らかにした。

3.4.1 糞便検体の採取と保存

排便後 30 分以内に採取されたイヌの糞便検体は、1 検体につき RNAlater および FTA card の 2 種類の核酸安定化製品を用いて 5 標本ずつ採取した。その後、下述の方法で即日 RNA 抽出を行なった。また、糞便検体の代わりに MoBio 付属の RNase-Free Water を添加した第一陰性コントロール (NC1)、糞便検体の代わりに何も塗布していない FTA card を添加した第二陰性コントロール (NC2) を作成した。

3.4.1.1 FTA card を用いた糞便検体の採取と保存

FTA card を用いた糞便検体の採取と保存は、3.3.1 FTA card を用いた糞便検体の採取と保存と同様な手順で行った。

3.4.1.2 RNAlater を用いた糞便検体の採取と保存

約 2 g の糞便検体は、RNAlater 2 mL を予め添加した 15 mL コニカル遠心チューブに採取した。チューブ内で糞便を十分に混和後、約 4 $^{\circ}$ C に冷却したクーラーボックス内に一時的に保存され、研究室にて 2 時間以内に -80° C で凍結保存した。その後、下述の方法で即日 RNA 抽出を行なった。また、糞便検体の代わりに MoBio 付属の RNase-Free Water を添加した第一

陰性コントロール（NC1）、糞便検体の代わりに何も塗布していないFTA card を添加した第二陰性コントロール（NC2）を作成した。

3.4.2 糞便検体の前処理

3.4.2.1 FTA card を用いて保存された糞便検体の前処理

MoBio を用いた RNA 抽出のための FTA card に塗布し保存された糞便検体の前処理は、先述の 3.3.2.2 FTA card に塗布された糞便検体の前処理と同様な手順で行なった。

3.4.2.2 RNeasy を用いて保存された糞便検体の前処理

RNeasy を用いて保存した糞便検体は 4 °C で 1 時間融解後、遠心分離機で 15 000 × rpm 1 分間遠心し、上清を完全に取り除いた。糞便沈殿物から 0.25 g を計り取り、MoBio 付属のビーズチューブに加えた。

3.4.3 RNA 抽出および DNase 処理

各前処理を行った糞便検体は、先述の 3.1.3.2 MoBio を用いた RNA 抽出と同様の手順で MoBio を用いて、キット添付のプロトコールに従い RNA 抽出および DNase 処理を行った。その後抽出した RNA の濃度および純度、品質の測定は、先述の 3.1.4 抽出した RNA の濃度および純度の測定から 3.1.5 抽出した RNA の品質の評価と同様の手順で行った。

3.5 実験 5 FTA card および RNeasy に保存したヒト糞便検体内 RNA の比較

FTA card および RNeasy の 2 種類の核酸安定化製品を実際にフィールド研究において適用し、保存されたヒトの糞便検体から抽出した RNA の濃度および純度、品質を比較検討した。その後、抽出した RNA 内のヒト由来のメッセンジャーRNA（mRNA）の存在をハウスキーピング遺伝子の一種である GAPDH（Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase）遺伝子を RT-PCR 法によって増幅し、電気泳動にて確認した。

3.5.1 糞便検体の採取と保存

ペルー共和国リマ市内南部のコミュニティにおける、ノロウイルスおよびサポウイルスに関する約 300 人を対象とした生誕コホート研究に参加していた 3 歳未満の 14 人の乳児の糞便検体は、フィールドナースによって排便後 1 時間以内に採取され、1 検体につき FTA card と RNeasy 2 種類の核酸安定化製品を用いて保存した。ヒト糞便検体の採取についてはペルー共和国、カエタノ大学、米国のジョンズホプキンス大学の倫理委員会にて承認を取得した。また、ペルー共和国から輸送した検体の解析についても東北大学の倫理委員会にて承認を取得した。

3.5.1.1 FTA card を用いた糞便検体の採取と保存

約 0.1 g の糞便を、FTA card 上の 4 つのサンプルエリアに均一に塗布し、室温で 1 時間乾燥させた。その日の糞便検体採取が終了するまで約 4 °C に冷却したクーラーボックス内に一時的に保存し、その後現地の研究室にて -20 °C で約 2 ヶ月間保存した。その後検体は -20 °C の温度管理下で輸送され、当研究室にて -20 °C で保存した。その後、下述の方法で即日 RNA の抽出を行なった。また、糞便検体の代わりに UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water を添加した第一陰性コントロール (NC1) 、糞便検体の代わりに何も塗布していない FTA card を添加した第二陰性コントロール (NC2) を作成した。

3.5.1.2 RNeasy を用いた糞便検体の採取と保存

約 0.3 g の糞便は、RNeasy 300 µL を予め添加した 1.5 mL マイクロチューブに採取した。1.5 mL マイクロチューブ内で糞便を十分に混和後、その日の糞便検体採取が終了するまで約 4 °C に冷却したクーラーボックス内に一時的に保存し、その後現地の研究室にて -20 °C で約 2 ヶ月間保存した。検体は -20 °C の温度管理下で輸送され、当研究室にて -20 °C で保存した。その後、下述の方法で即日 RNA の抽出を行なった。また、糞便検体の代わりに UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water を添加した第一陰性コントロール (NC1) 、糞便検体の代わりに RNeasy を添加した第二陰性コントロール (NC2) を作成した。

3.5.2 糞便検体の前処理

3.5.2.1 FTA card を用いて保存された糞便検体の前処理

FTA card を用いて保存された糞便検体は、 -20°C の冷凍庫から取り出した後、1 時間室温で乾燥させた。その後 FTA card の 4 つのサンプルエリアのうち 4 つをカッターで切り取り、2 mL マイクロチューブ内に入れた。予め 55°C に保温した MoBio 付属の Solution PM1 650 μL と 2-メルカプトエタノール 6.5 μL を FTA card が入った 1.5 mL マイクロチューブに添加し、Vortex Adapter for 24 (1.5—2.0 mL) tubes を装着したボルテックスミキサーで 10 分間反応後、遠心分離機で $13\,000 \times g$ 1 分間遠心した。5 mL シリンジ内に上清と FTA card を加え、液体成分を MoBio 付属のビーズチューブ内に押し出した。

3.5.2.2 RNeasy 用いて保存した糞便検体の前処理

RNeasy 内に保存された糞便検体は 4°C で 1 時間融解後、遠心分離機で $15\,000 \times \text{rpm}$ にて 1 分間遠心し、上清を完全に取り除いた。糞便沈殿物から 0.25 g を計り取り、MoBio 付属のビーズチューブに加えた。

3.5.3 RNA 抽出および DNase 処理

各前処理を行った糞便検体は、3.1.3.2 で述べた MoBio を用いた RNA 抽出と同様の手順で RNA 抽出および DNase 処理を行った。抽出した RNA は UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water 100 μL で溶解した。

3.5.4 抽出した RNA の濃度および純度の測定

抽出した RNA の濃度は、Qubit RNA BR Assay Kit および Qubit RNA HS Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) を用いて Qubit 2.0 Fluorometer で測定した。抽出した RNA の純度（吸光度 A260/A280 比および吸光度 A260/A230 比）は、NanoDrop One 超微量紫外可視分光光度計を用いて測定した。

3.5.5 抽出した RNA の品質の測定

抽出した RNA の品質は、RIN および電気泳動の結果で確認した。

3.5.5.1 電気泳動

0.5 × TBE Buffer を加えた電気泳動装置で 100 V 30 分間電気泳動を行った。0.5 × TBE Buffer に 1 % エチジウムブロマイドおよび 1 % UltraPure Agarose を溶解し作成したゲルを設置後、抽出した RNA (200 ng/10 μ L 以上) および 6 × Loading Dye (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) の混合物をウェルに注入した。但し、抽出された RNA 濃度が 10 ng/ μ L 以上の検体のうち RNA の濃度を 200 ng/10 μ L に調整できない検体は、最大 10 μ L および 6 × Loading Dye の混合物をウェルに注入した。また、泳動後のバンドの位置に基づく分子量の指標として、1 kb DNA Ladder および 6 × Loading Dye の混合物をウェルに注入した。さらに、陰性コントロール (NC1 ・ NC2) 、28S rRNA および 18S rRNA の 2 種類のバンドが確認できる陽性コントロール (PC) としてヒト由来の細胞株から抽出した RNA を用いた。また、Qubit RNA HS Assay Kit を用いて RNA の濃度が測定できなかった RNA は、電気泳動においてバンドの検出は不可能であるとして、今回の電気泳動による RNA の品質の解析には含まなかった。

3.5.5.2 RIN の測定

RIN は、Agilent RNA 6000 ナノキットおよび Agilent RNA 6000 ピコキット (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) を用いて、Agilent 2100 バイオアナライザーでキット添付のプロトコールに従い、測定した。

3.5.6 糞便検体から抽出した RNA におけるヒト由来 RNA の測定

抽出された RNA 内のヒト由来の RNA の存在を確認するために、ヒト由来 GAPDH (Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) 遺伝子の 2 種類の異なる増幅断片用のプライマー (505 bp ・ 1009 bp) を用いてコンベンショナル PCR を行なった。また同時に、糞便検体から抽出された RNA の代わりにヒト由来の細胞から抽出された RNA を用いて作成した陽性コントロール 1 (PC1) 、糞便検体から抽出した RNA から合成した GAPDH cDNA の代わりにヒト由来の細胞から抽出された RNA を用いて合成した GAPDH cDNA を使用して作成した陽性

コントロール 2 (PC2)、糞便検体から抽出された RNA の代わりに滅菌 Mili-Q 水を使用して作成した陰性コントロール (NC) を使用した。

3.5.6.1 cDNA 合成

抽出した RNA 10 μ L は、10 mM dNTP Mix 1 μ L、Oligo dT primer (500 ng/ μ L) (株式会社ファスマック、神奈川、日本) 1 μ L、滅菌 Mili-Q 水 1 μ L と共に 0.2 mL チューブ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) 内に添加され、予め 65 $^{\circ}$ C に保温したアルミブロック恒温槽 (株式会社タイテック、愛知、日本) 上で 5 分間反応させた後、氷上で 4 分間冷却した。反応産物 13 μ L に 5 \times First-Strand Buffer 4 μ L、0.1M DTT 1 μ L、RNase out inhibitor (40 units/ μ L) 1 μ L、Super Script III RT (200 U/ μ L) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) 1 μ L を添加し、PCR サーマルサイクラー (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) で 25 $^{\circ}$ C 5 分、50 $^{\circ}$ C 60 分、70 $^{\circ}$ C 15 分を 1 サイクル反応させ、cDNA を合成した。

3.5.6.2 GAPDH コンベンショナル PCR

保存された核酸安定化製品により長鎖の RNA が分解されずに保持されているかを確認するために、同一 GAPDH 遺伝子を基に設計された 505 bp の増幅が期待できる GAPDH C RT-PCRmer amplification primer pair (GeneLink, Inc, Orlando, Florida, USA) と 1009 bp の増幅が期待できる GAPDH D RT-PCRmer amplification primer pair (GeneLink, Inc, Orlando, Florida, USA) の 2 種類の増幅サイズが異なるプライマーセットを使用した。作成した GAPDH cDNA を鋳型として 1 検体につき 2 種類のプライマーセットを用いて GAPDH コンベンショナル PCR を行なった。GAPDH cDNA 2 μ L、2.5 mM dNTP 4 μ L、10 \times Ex Taq Buffer 4.5 μ L、滅菌 Mili-Q 水 32 μ L を 0.2 mL チューブに添加し、10 pmol/ μ L GAPDH C RT-PCRmer amplification primer pair 2.5 μ L、または 10 pmol/ μ L GAPDH D RT-PCRmer amplification primer pair 2.5 μ L を添加した。これらの 0.2 mL チューブを PCR サーマルサイクラーで 95 $^{\circ}$ C 5 分間の初期変性後、50 $^{\circ}$ C で保温した。0.2 mL チューブを装置から取り出し、滅菌 Mili-Q 水 5 μ L、10 \times Ex Taq Buffer 0.5 μ L、TaKaRa Ex Taq polymerase (5

U/ μ L) (タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) 0.5 μ L で構成された Taq polymerase mix を各 5 μ L ずつ反応産物に添加した後、PCR サーマルサイクラーで 94 $^{\circ}$ C 30 秒、64 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 60 秒を 1 サイクルとし、計 30 サイクル行った後、最終伸長は 72 $^{\circ}$ C 7 分間で行った。

3.5.6.3 電気泳動

0.5 \times TBE Buffer を加えた電気泳動装置に 0.5 \times TBE Buffer 100 mL につき 1 % エチジウムブロマイドおよび 0.8 % UltraPure Agarose を溶解し作成したゲルを設置後、GAPDH PCR 産物 2 μ L および 2 \times Loading Dye 2 μ L の混合物をウェルに注入し、100 V で 30 分間電気泳動を行った。バンドの指標として、100 bp DNA Ladder (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) および 2 \times Loading Dye の混合物をウェルに注入した。さらに、陽性コントロール (PC1 \cdot PC2) および 2 \times Loading Dye の混合物、陰性コントロール (NC) および 2 \times Loading Dye の混合物を各ウェルに注入した。

3.6 統計解析

RNA 濃度、純度、RIN の比較には、それぞれ 2 群間の比較を Mann-Whitney U 検定を Stata Ver13.1 (Statacorp, College station, TX) で行い、P 値 < 0.05 を有意水準とした。

4. 結果

4.1 実験 1 イヌ糞便検体を用いた RNA 抽出キットの比較検討

4.1.1 抽出した RNA の濃度および純度

RNA 濃度の結果では、4 種類の RNA 抽出キットで抽出した RNA 濃度の中央値は、TRIzol 385.0 ng/ μ L、MoBio 212.0 ng/ μ L、MagMAX 93.6 ng/ μ L、Zymo 14.0 ng/ μ L であった。従って TRIzol では、他の 3 種類の RNA 抽出キットと比較して高濃度の RNA を抽出可能であった ($p < 0.02$) [図 3]。一方で RNA の純度の結果より、TRIzol を用いて抽出した RNA は、A260/A280 比および A260/A230 比の中央値が 2.0 以下であり [図 4]、タンパク質の混入および有機化合物な

どの残留が認められた。その一方で、MoBio を用いて抽出した RNA は、A260/A280 比および A260/A230 比の中央値が共に 2.0 以上であり、タンパク質の混入および有機化合物などの残留が他の RNA 抽出キットよりも少なく、比較的高い純度の RNA を抽出した。その上 MoBio では、TRIzol に次いで中央値が高い濃度の RNA が抽出可能であった。

4.1.2 抽出した RNA の品質

抽出した RNA の RIN の中央値は、いずれの RNA 抽出キットでも 1.8 から 2.6 と、抽出された RNA はほとんど分解されていた [図 5]。一方で、Zymo を用いて抽出した 5 標本中 4 標本の RNA は、RIN の測定限界濃度を下回っていたために、RIN の算出ができなかった。また電気泳動の結果では、いずれの RNA 抽出キットを用いた RNA の電気泳動像においても、RNA のバンドは確認できなかった [図 6]。

従って、2 番目に高濃度かつ、高純度な RNA が抽出できた MoBio を以降の核酸安定化製品の比較研究において使用することとした。

4.2 実験 2 RNAlater を用いて保存したイヌ糞便検体の RNA 抽出方法の検討

4.2.1 抽出した RNA の濃度および純度

4.2.1.1 糞便沈殿物と上清から抽出した RNA の濃度の比較

RNA 濃度の結果では、糞便沈殿物から抽出された RNA 濃度の中央値は、45.2 ng/ μ L であった [図 7]。これに対して上清から抽出した RNA の濃度は、全 5 標本中 5 標本で RNA 濃度が検出限界以下であった。

4.2.1.2 1 倍量と 3 倍量の RNAlater の糞便沈殿物から抽出した RNA の濃度および純度の比較

RNAlater の添加量に基づく希釈倍率の異なる糞便沈殿物の RNA 濃度の中央値は、1 倍量の希釈倍率では 105.0 ng/ μ L、3 倍量の希釈倍率では 45.2 ng/ μ L であり、1 倍量の希釈倍率では 3 倍量の希釈倍率と比較して約 2 倍以上の高濃度な RNA を抽出可能であった ($p < 0.01$) [図 8]。また RNA の純度の結果より、1 倍量の希釈倍率および 3 倍量の希釈倍率で共に

A260/A280 比が 2.0 以上であった [図 9] ことから、タンパク質の混入が少なかったものの、A260/A230 比は 2.0 以下であり、有機化合物などの残留は共に認められた。3 倍量の希釈倍率では、比較的著しい有機化合物などの残留が認められた ($p < 0.02$)。

4.2.2 抽出した RNA の品質

抽出した RNA の RIN の中央値は、1 倍量の希釈倍率および 3 倍量の希釈倍率で共に 2.5 と同程度の RIN を示し [図 10]、抽出された RNA はほとんど分解されていた。さらに電気泳動の結果では、抽出したいずれの RNA において、陽性コントロールと同様な 2 本のバンドの存在は確認できなかった。

4.3 実験 3 FTA card に保存したイヌ糞便検体を用いた RNA 抽出キットの比較検討

4.3.1 抽出した RNA の濃度および純度

4 種類の RNA 抽出キットで抽出した RNA 濃度の中央値は、それぞれ TRIzol 202.0 ng/ μ L、MoBio 80.5 ng/ μ L、MagMAX 33.7 ng/ μ L、Zymo 24.9 ng/ μ L であった。Zymo で抽出した全 5 標本の RNA のうち 3 標本で RNA 濃度は検出限界以下であった [図 11]。また、TRIzol を用いた場合には、他の RNA 抽出キットと比較して高濃度の RNA を抽出可能であった ($p < 0.01$)。一方、RNA の純度は、TRIzol を用いて抽出した RNA では、A260/A280 比および A260/A230 比の中央値は 2.0 以下であり [図 12]、タンパク質の混入および有機化合物などの残留が認められた。その一方、MoBio を用いて抽出した RNA は、TRIzol に次いで 2 番目に高い濃度かつ、A260/A280 比および A260/A230 比の中央値は 2.0 以上であり、タンパク質の混入および有機化合物の残留が比較的少なかった ($p < 0.01$)。また、Zymo で抽出した検出限界以下の RNA 濃度であった 3 標本の純度は、RNA そのものの純度を反映していないとして RNA 純度を評価しなかった。

4.3.2 抽出した RNA の品質

MoBio で抽出した RNA の RIN の中央値は、5.0 といずれの RNA 抽出キットで抽出された RNA の中でも最も高い RIN を示した ($p < 0.01$) [図 13]。一方、TRIzol および MagMAX で抽出し

た RNA の RIN の中央値は、約 2.0 前後と抽出された RNA はほとんど分解されていた。また、Zymo を用いて抽出した 5 標本中 3 標本の RNA は、RIN の測定限界濃度を下回っていたために、RIN が算出できなかったものの、RIN の算出ができた 2 標本中 1 標本は、RIN = 4.8 と比較的高い RIN を示した。また電気泳動の結果では、MoBio で抽出した RNA のみ 2 本のバンドの存在が確認できたが、陽性コントロールのバンドの位置よりも低い位置であった [図 14]。

4.4 実験 4 FTA card 及び RNeasy には保存したヒト糞便検体内 RNA の比較

4.4.1 抽出した RNA の濃度および純度

RNA 濃度の結果では、中央値が 105.0 ng/ μ L であった RNeasy に比べ、FTA card から抽出した RNA の中央値は 179.0 ng/ μ L と高濃度の RNA が抽出できた ($p < 0.01$) [図 15]。RNA の純度の結果では、FTA card および RNeasy で共に A260/A280 比の中央値が 2.0 以上と [図 16]、タンパク質の混入は少なかった。有機化合物などの残留については、RNeasy で A260/A230 比の中央値が 2.0 以下であり、有機化合物などの残留が示唆された一方で、FTA card では A260/A230 比の中央値が 2.0 以上であり、有機化合物などの残留は少なく、高純度な RNA が抽出されていた ($p < 0.01$)。

4.4.2 抽出した RNA の品質

FTA card においては RIN の中央値が 4.2 に対し、RNeasy においては中央値が 2.5 であった [図 17]。また電気泳動の結果では、FTA card に保存した検体から抽出した RNA では 2 本のバンドの存在を確認できたが、陽性コントロールのバンドの位置よりも低い位置であった [図 18]。一方 RNeasy では、明確な 2 本のバンドの存在を確認できず、陽性コントロールのバンド位置付近にスメア状のブロードなバンドとして確認した。

4.5 実験 5 FTA card および RNeasy に保存したヒト糞便検体内 RNA の比較

4.5.1 抽出した RNA の濃度および純度

FTA card に保存し、抽出した 14 検体中 6 検体 (43 %) で RNA の濃度は検出限界以下であり [図 19]。RNA 濃度が測定できた 8 検体における中央値は 23.0 ng/ μ L であり、RNeasy

に保存し、抽出した RNA の中央値 79.9 ng/ μ L と比べて低濃度であった ($p < 0.01$)。また RNA の純度については、RNAlater および FTA card において A260/A280 比および A260/A230 比の中央値が共に 2.0 以下であり [図 20]、タンパク質の混入および有機化合物などの残留が認められた。FTA card で保存し、抽出した検出限界以下の RNA 濃度であった 6 検体の純度は、RNA そのものの純度を反映していないとして、RNA 純度を評価しなかった。

4.5.2 抽出した RNA の品質

RIN の結果 [図 21] より、FTA card においては RIN の中央値が 4.1、最高値が 7.1 に対し、RNAlater においては RIN の中央値が 2.4、最高値が 3.9 であった。FTA card で抽出可能であった RNA の RIN は、RNAlater で抽出可能であった RNA の RIN と比較して高い値であった ($p < 0.01$)。また電気泳動の結果では、FTA card においては電気泳動を行った 7 標本中 4 標本で 2 本のバンドの存在を確認した [図 22]。一方 RNAlater では、電気泳動を行った 14 標本中 1 標本で 2 本のバンドの存在を確認したが、残りの 13 標本では明確な 2 本のバンドの存在を確認できず、陽性コントロールのバンドの位置付近にスメア状のブロードなバンドとしてのみ確認された。しかしいずれの抽出された RNA の 2 本のバンドは、陽性コントロールのバンドの位置よりも低い位置であった。

4.5.3 抽出した RNA 内におけるヒト由来 mRNA の存在

電気泳動の結果では、ヒト由来の GAPDH と同じ位置にバンドが検出されたのは、505 bp の検出において RNAlater に保存された 2MS13C-R の 1 検体のみであった [図 23]。一方で GAPDH 1009 bp の検出においては、全検体で特異的なバンドは検出されず、505 bp の検出においてバンドを確認した 2MS13C-R においても特異的なバンドは検出されなかった。

5. 考察

本研究では、RNA 抽出キットや核酸安定化製品により、糞便検体から抽出された RNA の濃度や純度、品質に違いがあることを明らかにした。RNA 抽出キットの比較では、糞便検体にお

いて MoBio が最も高純度かつ高い品質を保持した RNA を抽出可能であること、核酸安定化製品においては、FTA card を用いた糞便検体の保存方法が検体内の RNA の分解を防ぎ、高い品質の RNA を抽出できることを明らかにした。しかし、核酸安定化製品別の RNA 濃度の比較結果はイヌとヒトの検体で一致せず、ヒトの検体では低濃度の検体があったため、それらについては純度の評価も十分にできなかった。

RNA 抽出キットの検討において、MoBio で最も高純度の RNA を抽出可能であり、核酸安定化製品を使用せず保存した場合と FTA card に保存した場合のいずれにおいても RNA は高純度であった。その要因として、MoBio には唯一 Inhibitor removal solution (阻害剤除去溶液) がキット内に含まれており [表 1]、この阻害剤除去溶液の効果により高純度な RNA を抽出可能であったと考えられる。一方、RNA の品質においては、FTA card に保存された糞便検体を MoBio で抽出した場合のみ比較的高い品質が保持されていた。この要因として、糞便検体の溶解時に唯一 MoBio で添加する 2-メルカプトエタノールの効果が挙げられる。2-メルカプトエタノールは、通常グアニジンチオシアン酸塩が含まれる溶解緩衝液と共に添加する事で、試料内に含まれる RNA の分解作用を持つ RNase に対する強力な変性作用をもたらし、RNase が含まれる試料から高い品質の RNA の抽出を可能とする²⁹。この 2-メルカプトエタノールの効果により、比較的高い品質を保持した RNA を抽出可能であったと考えられる。また、FTA card に保存した糞便検体を MoBio で抽出した RNA における RIN は 7.1 が最高値であったが、この値はイルミナ社の RNA シークエンス解析の推奨値である RIN = 8 以上²³には届かなかった。また興味深いことに、FTA card に保存した糞便検体を MoBio で抽出した RNA においてのみ高い品質を保持していた一方で、MoBio 以外の RNA 抽出キットで抽出した RNA は、核酸安定化製品を使用せずに保存した糞便検体から抽出した RNA および RNAlater で保存した糞便検体から抽出した RNA と同様に RIN = 2 前後と抽出した RNA はほとんど分解されていた。このことより、FTA card を用いた糞便検体の保存および MoBio を用いた RNA 抽出を組み合わせることで、高い品質を保持した RNA を抽出できることを明らかにした。

Zymo での FTA card に保存されたイヌの糞便検体を用いた RNA の抽出においては、抽出された RNA のうち、1 標本において RIN = 4.8 という比較的高い品質を保持した RNA を抽出できたが、5 標本中 3 標本において RNA の濃度が検出限界以下であった。このことから、この

スピンフィルターは RNA 自体をも捕捉してしまっている事が示唆された。一方、TRIzol は、4 種類の RNA 抽出キットの中で最も高濃度な RNA を抽出可能であったが、抽出された RNA の純度および品質は低く、比較的長い RNA 断片を必要とする解析や実験には適していないと考えられる。また、MagMAX においては、低濃度かつ低純度な分解された RNA を抽出した。従って、4 種類の RNA 抽出キットのうち 2 番目に高濃度かつ最も高純度な高い品質を保持した RNA を抽出可能である MoBio が最も優れていると考えた。

糞便検体の保存方法については、イヌの糞便検体を用いた実験において、RNAlater と比較して FTA card が高濃度かつ高純度な高い品質を保持した RNA を抽出可能であったことを明らかにした。一方でヒトの糞便検体を用いた実験においては、RNAlater に保存した検体からは比較的高濃度な RNA を抽出可能であったが、抽出した RNA の純度は低く、分解されていた。また FTA card に保存した検体からは、高い品質を保持した RNA を抽出可能であったが、その濃度や純度は低かった。

抽出された RNA の濃度において、イヌの糞便検体を用いた実験では FTA card、ヒトの糞便検体を用いた実験では RNAlater を用いた保存方法で高濃度な RNA の抽出が可能であった。ヒトの糞便検体から抽出した RNA の濃度において、FTA card を用いた保存方法で抽出した RNA の濃度は、4 割の検体で検出限界以下であり、測定できたものでも RNAlater より低濃度であった。他の報告でも FTA card に保存されたヒト糞便検体から抽出した DNA の濃度は、非常に低濃度であったとされ²⁸、FTA card に保存された糞便検体から抽出した核酸の濃度の低さについては、今後の大きな課題である。この課題の解決に際し障壁となるものの一つとしてとして、FTA card への糞便検体の塗布量および RNA 抽出に用いる糞便検体の量を標準化することの難しさが挙げられる。本研究では、FTA card に保存したヒトの糞便検体を用いた RNA の濃度において、FTA card に保存したイヌの糞便検体から抽出した RNA の濃度と同様の結果を得られなかったことから、FTA card から糞便成分を押し出す工程で、押し出す回数や試薬量の最適化を行なったが、いずれの方法においても FTA card に保存したヒトの糞便検体から抽出した RNA は、低濃度であった。本研究では、FTA card のサンプルエリア数で各糞便検体量の標準化を図っていたが、実際には糞便検体の塗布量にばらつきが見られたため、サンプルエリア数で各糞便検体の量を一定にするのではなく、RNA 抽出に

用いる FTA card の重さで各糞便検体の量を一定にするなど、RNA 抽出に用いる FTA card 内の糞便検体量の標準化が今後の課題である。また、十分な量の糞便が採取できていなかったこと、乳児の糞便検体内にヒト由来の細胞数が少ない可能性が他の要因として推測できる。しかし、RNAlater に保存された同一乳児の糞便検体からは、比較的高い濃度の RNA が抽出できたことから、この可能性については、更なる実験によりその因果関係の解明が必要であると考ええる。

抽出した RNA の純度において、RNAlater を用いて抽出した RNA はイヌおよびヒトの糞便検体のいずれにおいても低純度であった。FTA card を用いたイヌ糞便検体の実験では高純度な RNA の抽出が可能であったが、ヒトの糞便検体を用いた実験では RNAlater および FTA card ではいずれも低純度な RNA しか抽出できなかった。また、RNAlater に保存された糞便検体から抽出した RNA においては、塩やアルコールなどの有機化合物の残留が常に認められた。このことは、RNAlater に含まれる高濃度の硫酸アンモニウムが検体内の細胞に浸透する³⁰ため、塩が残留してしまい RNA の純度に影響を与えてしまった可能性がある。また、FTA card 内に保存されたヒトの糞便検体から抽出した RNA が低純度であったことについては、抽出された RNA の濃度が少なかったために RNA そのものの純度を反映していないと考察した。

抽出した RNA の品質においては、先述したように FTA card に保存した糞便検体を MoBio で抽出した RNA においてのみ高い品質を保持していたが、以前より広い用途で使用されていた RNAlater は、糞便検体においては FTA card に比べ高い品質の RNA の保存の役割を果たしていない事が明らかになった。一方で Reck らの研究では、RNAlater 内の糞便検体を MoBio で抽出した RNA において、RIN = 9 以上の高い品質を保持した RNA が抽出されている⁶。このことは、Reck らは保存した糞便検体から抽出した細菌由来の細胞のみを RNA 抽出に用いていたため、このような高い品質を保持した RNA の抽出を実現させたと考えられる。従って、糞便検体内の細菌由来の細胞以外の RNA の抽出を目的とした RNAlater による糞便検体の保存には更なる保存方法の検討が必要であると考ええる。

以上のことから、ヒトの糞便検体を用いる場合はそれ以降の実験や解析の進め方によって核酸安定化製品を使い分ける必要があると考ええる。ヒトの糞便検体を用いた実験において、FTA card が比較的高い品質を保持した RNA を抽出可能であったことから、抽出された RNA を

比較的長い RNA 断片を必要とする解析や実験には、FTA card が有用な核酸安定化製品であることを明らかにした。また、比較的長い RNA 断片を必要としない解析や実験には、ヒトの糞便検体を用いた実験において比較的高濃度な RNA を抽出可能であった RNAlater が有用な核酸安定化製品であることを明らかにした。

比較的高い品質を保持した RNA を抽出可能であった FTA card における検体保存の機序については、FTA card 内で細胞の膜構造が壊され、DNA が FTA card 内の繊維に固定・安定化されることが説明されているが³¹、RNA については明らかにされていない。また、濾紙の水分を吸収する性質からその機序を推測するに、FTA card は検体内の水分を吸収し検体を乾燥させることで、検体内の核酸の分解を防いでいるのではないかと推測した。Jones らは、試料塗布後の FTA card の不完全な乾燥は、mRNA の検出効率に悪影響を及ぼすことを明らかにし、FTA card の湿気を除去することは RNA の分解を遅らせる可能性があると考えしている³²。また Seelenfreund らも、リアルタイム PCR や RNA シークエンスなどの解析において、乾燥により保存された RNA の結果は、凍結により保存された RNA に匹敵すると報告しており³³、乾燥が RNA の分解を防ぎ、RNA の保存に効果的である可能性が示唆された。

FTA card に保存されたヒトの糞便検体から抽出した RNA は、高い品質であることを明らかにしたものの、電気泳動の結果においてヒトの細胞由来の陽性コントロールと比較してバンドの位置が低位置であったこと、FTA card で保存したヒトの糞便検体から抽出した RNA を用いたヒト由来 GAPDH コンベンショナル PCR の結果において、ヒト GAPDH に特異的なバンドがほとんどの検体で検出されなかったことから、抽出した RNA 内にはヒト由来の mRNA はごく微量で、細菌の 16S rRNA および 23S rRNA が抽出されていた可能性が示唆された。つまり本研究においては、ヒトの糞便検体から高い品質を保持した RNA を抽出したにも関わらず、ヒトの mRNA の存在を確認することができなかった。その要因として、もともと細胞内においても mRNA の占める割合は RNA のうちごくわずかであり⁴、糞便検体内にはヒト由来の細胞そのものの占める割合が低く、今回 FTA card に採取された乳児の糞便検体からは十分な量の mRNA が抽出できなかったと考察した。その一方で、フィールド研究において保存された糞便検体から比較的高い品質が保持された RNA を抽出可能であったことは、フィールド研究において採取された糞便検体内の RNA を用いた研究の推進が期待できる。

本研究ではイヌとヒト検体における結果に違いが見られたが、両実験間で糞便検体保存から RNA 抽出までの保存期間が各実験間において異なること、FTA card で保存されたイヌ糞便検体は 4 °C 保存、ヒトにおいては -20 °C 保存と保存温度条件の差異があること、RNA 抽出に用いた FTA card の量がイヌ糞便検体とヒト糞便検体で異なることなどの相違点があった。保存期間については、イヌ糞便検体を用いた実験 1・2・4 では、即日 RNA を抽出したが、実験 3 では 1 ヶ月間保存しており、ヒトの検体と同等の保存期間であった。また、FTA card の量については、FTA card 上の 2 つのサンプルエリアを RNA 抽出に使用するとヒトの糞便検体では、抽出された RNA 濃度が 5 標本中 2 標本で検出限界以下の濃度であった。そのため、FTA card 上の 4 つのサンプルエリアを RNA 抽出に使用した。ゆえにこれらの相違点は、本結果にそれほど大きな影響を与えていないと考える。

今後は、FTA card で保存されたヒトの糞便検体から高濃度な RNA を抽出するために、RNA 抽出方法の最適化に努め、FTA card への糞便検体の塗布量および RNA 抽出に用いる糞便検体の量を標準化する必要がある。また、抽出された低濃度の RNA を濃縮する方法についても検討が必要である。さらに、RNA 抽出に用いたイヌの糞便検体が塗布された FTA card 量と同量のヒトの糞便検体が塗布された FTA card から抽出された RNA の濃度を比較することで、本結果がヒトの糞便検体の性状による RNA 濃度の低下であるかどうか確認する必要がある。

本研究は、FTA card を用いた糞便検体の保存および MoBio を用いた RNA 抽出を組み合わせることで高い品質を保持した RNA を抽出可能であることを明らかにした。しかし一方で、ヒトの糞便検体を用いた場合には、抽出された RNA の濃度は低かった。濃度の課題はあるが、抽出された RNA の品質において FTA card が RNeasy と比較して高い品質を保持した RNA を抽出可能であったことは、新しい知見であった。本研究で得られた知見は、糞便検体を対象としたフィールド研究に有用であると考ええる。

6. 結論

糞便中の高品質・高純度・高濃度な RNA を抽出するためには、目的に応じて RNA 抽出キットおよび核酸安定化製品を選択する必要がある。ヒトの糞便検体中のヒト由来の RNA については、検体採取方法を含め更なる検討が必要である。さらに糞便検体中の RNA を対象としたフィールド研究の発展には、既存の保存技術に加え、高い品質の RNA をより高濃度で抽出することが可能な技術の開発が必要である。

7. 謝辞

本研究を行うにあたり、押谷仁教授、斉藤繭子准教授には、終始熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました。また、微生物学分野に所属する先生方をはじめとする学生およびスタッフの皆様にも、研究を進めるにあたって多くの助言を頂きました。さらに、生誕コホート研究に参加していた乳児とその保護者の方々には、本研究に欠かせない糞便検体の提供にご協力頂きました。また、フィールドナースの皆様には、糞便検体の採取にご協力頂きました。ご協力頂いた皆様に心より御礼申し上げます。

8. 参考文献

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K. Molecular Biology of THE CELL. 6th edition. New York: Garland Science; 2015. p.299–438.
2. Karp G. CELL AND MOLECULAR BIOLOGY. 5th edition. New jersey: Wiley Publishing, Inc; 2007. p.42–84.
3. Robinson TR. Genetics For Dummies. 2nd Edition. New jersey: Wiley Publishing, Inc; 2010. p.129–142.
4. Sambrook J, Green MR. Molecular cloning: A laboratory manual. 4th edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. p.365–392, 450–451.
5. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, et al. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* 2005;33(6):e56.
6. Reck M, Tomasch J, Deng Z, et al. Stool metatranscriptomics: A technical guideline for mRNA stabilisation and isolation. *BMC Genomics* 2015;16:494.
7. Herberg JA, Kaforou M, Wright VJ, et al. Diagnostic Test Accuracy of a 2-Transcript Host RNA Signature for Discriminating Bacterial vs Viral Infection in Febrile Children. *JAMA* 2016;316(8):835–45.
8. Suzuki S, Horinouchi T, Furusawa C. Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. *Nat Commun* 2014;5:5792.
9. Enosi Tuipulotu D, Netzler NE, Lun JH, Mackenzie JM, White PA. RNA Sequencing of Murine Norovirus-Infected Cells Reveals Transcriptional Alteration of Genes Important to Viral Recognition and Antigen Presentation. *Front Immunol* 2017;8:959.
10. Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *The Lancet* 2003;362(9393):1353–8.
11. Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. *Bull World Health Organ* 1978;56(2):247–70.
12. Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods* 2003;114(1):37–44.
13. Roos-van Groningen MC, Eikmans M, Baelde HJ, de Heer E, Bruijn JA. Improvement of extraction and processing of RNA from renal biopsies. *Kidney Int* 2004;65(1):97–105.
14. Link A, Balaguer F, Shen Y, et al. Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 2010;19(7):1766–74.

15. Kalimutho M, Del Vecchio Blanco G, Di Cecilia S, et al. Differential expression of miR-144* as a novel fecal-based diagnostic marker for colorectal cancer. *J Gastroenterol* 2011;46(12):1391–402.
16. El-Khoury V, Pierson S, Kaoma T, Bernardin F, Berchem G. Assessing cellular and circulating miRNA recovery: the impact of the RNA isolation method and the quantity of input material. *Sci Rep* 2016;6:19529.
17. Kasahara T, Miyazaki T, Nitta H, et al. Evaluation of methods for duration of preservation of RNA quality in rat liver used for transcriptome analysis. *J Toxicol Sci* 2006;31(5):509–19.
18. Kono N, Nakamura H, Ito Y, Tomita M, Arakawa K. Evaluation of the impact of RNA preservation methods of spiders for de novo transcriptome assembly. *Mol Ecol Resour* 2016;16(3):662–72.
19. Passow CN, Kono TJY, Stahl BA, Jaggard JB, Keene AC, McGaugh SE. Nonrandom RNAseq gene expression associated with RNAlater and flash freezing storage methods. *Mol Ecol Resour* 2018; Accepted for publication.
20. Angebault C, Ghoulane A, Volant S, Botterel F, d'Enfert C, Bougnoux M-E. Combined bacterial and fungal intestinal microbiota analyses: Impact of storage conditions and DNA extraction protocols. *PloS One* 2018;13(8):e0201174.
21. GE Healthcare UK Limited. Whatman FTA cards. [Internet]. 2011 [cited 2018 Dec 29]; Available from: https://www.gelifesciences.co.jp/tech_support/manual/pdf/28984354%20AA_FTA%20CardsDataSheet.pdf.
22. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 2006;7:3.
23. Illumina, Inc. RNA-Seq ~研究に合わせたアプリケーションの選び方~ [Internet]. 2014 [cited 2018 Dec 26]; Available from: https://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/2015_techsupport_session7.pdf.
24. Strand C, Enell J, Hedenfalk I, Fernö M. RNA quality in frozen breast cancer samples and the influence on gene expression analysis--a comparison of three evaluation methods using microcapillary electrophoresis traces. *BMC Mol Biol* 2007;8:38.
25. Mueller O, Lightfoot S, Schroeder A. RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control [Internet]. *RNA Integr. Number RIN – Stand. RNA Qual. Control*. 2004 [cited 2019 Jan 18]; Available from: <https://www.chem-agilent.com/pdf/5989-1165EN.pdf>

26. Martin NM, Cooke KM, Radford CC, Perley LE, Silasi M, Flannery CA. Time course analysis of RNA quality in placenta preserved by RNAlater or flash freezing. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989 2017;77(4).
27. Sinha R, Chen J, Amir A, et al. Collecting Fecal Samples for Microbiome Analyses in Epidemiology Studies. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 2016;25(2):407–16.
28. Nechvatal JM, Ram JL, Basson MD, et al. Fecal collection, ambient preservation, and DNA extraction for PCR amplification of bacterial and human markers from human feces. *J Microbiol Methods* 2008;72(2):124–32.
29. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18(24):5294–9.
30. Lader ES. Methods and reagents for preserving RNA in cell and tissue samples. U.S. Patent 6,528,641B2 [Internet]. 2003 [cited 2019 Jan 18];Available from: <https://patents.google.com/patent/US6528641B2/en>
31. GE Healthcare UK Limited. FTA cards: high-quality media for storage and transport of DNA [Internet]. 2015 [cited 2018 Dec 29];Available from: https://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf/29156954AA_FTA_Whitepaper.pdf
32. Jones S, Sutherland CJ, Hermsen C, et al. Filter paper collection of *Plasmodium falciparum* mRNA for detecting low-density gametocytes. *Malar J* 2012;11:266.
33. Seelenfreund E, Robinson WA, Amato CM, Tan A-C, Kim J, Robinson SE. Long term storage of dry versus frozen RNA for next generation molecular studies. *PloS One* 2014;9(11):e111827.

9. 図・表

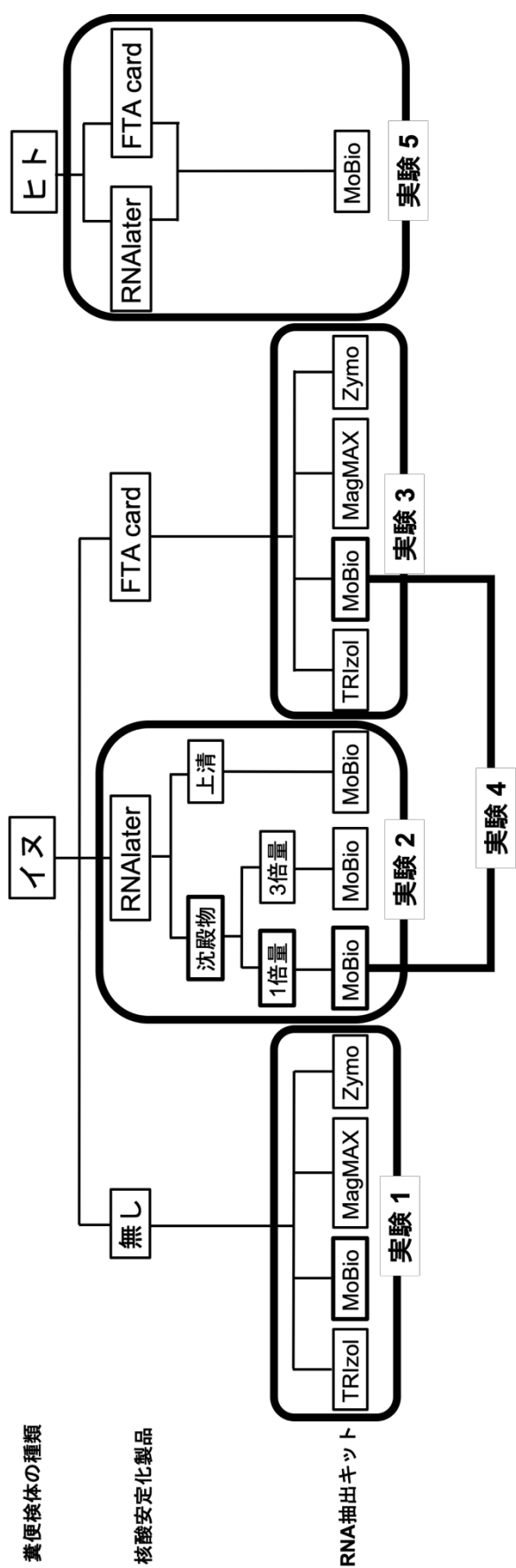


図 1. 実験の流れ

本研究は、図 1 の流れで行った。

FTA card : FTA Classic Card, RNAlater : RNAlater Stabilization Solution,

TRIZOL : TRIZOL LS Reagent, MoBio : RNeasy PowerMicrobiome Kit, MagMAX :

MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Kit, Zymo : Quick-RNA Miniprep Kit

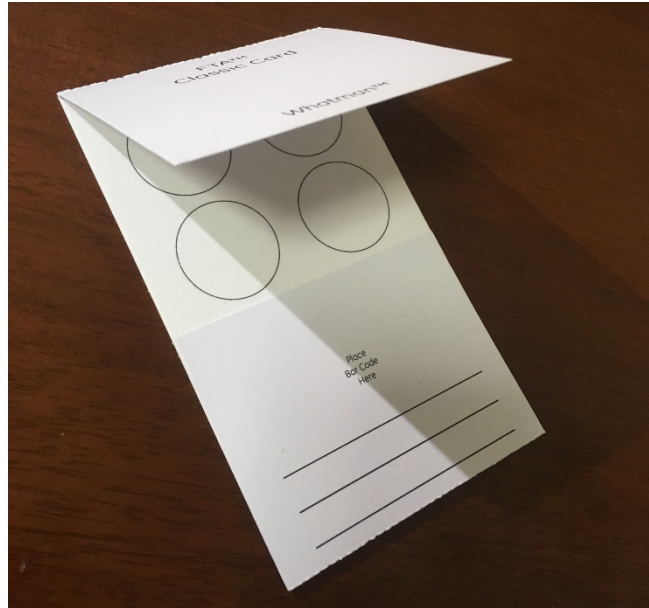


図 2. FTA Card

核酸安定化製品の一つである FTA Card を本研究の糞便検体の採取に使用した。

FTA card : FTA Classic Card

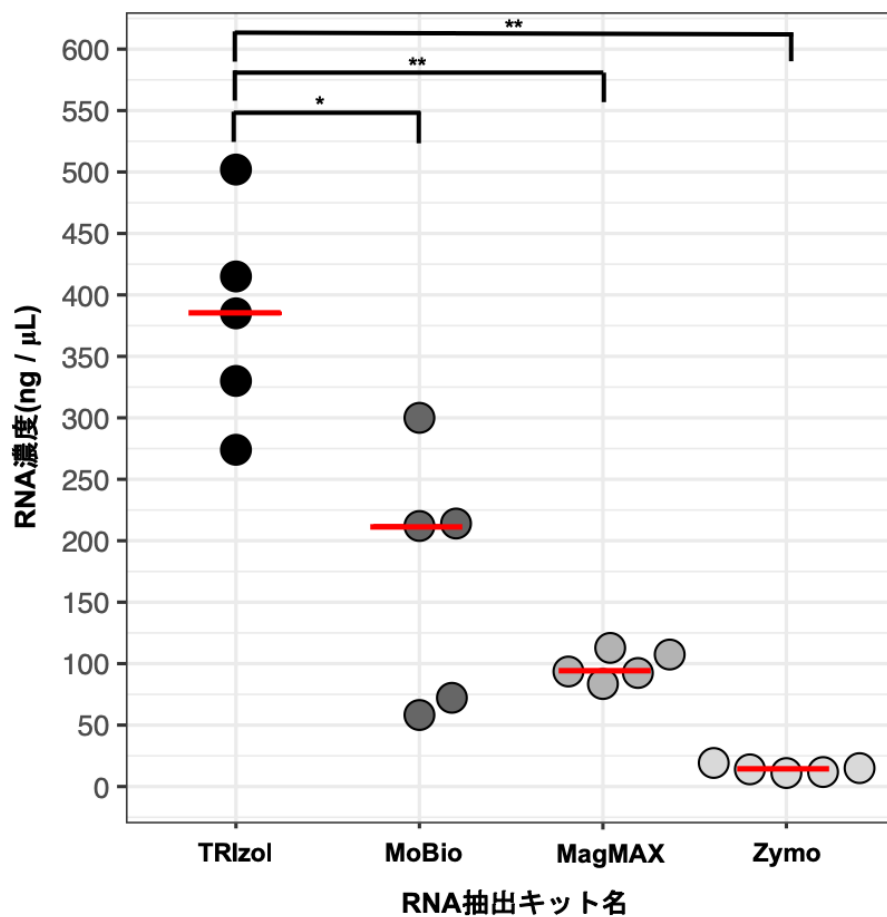


図 3. RNA 抽出キット別のイヌ糞便検体から抽出した RNA の濃度の比較

4 種類の RNA 抽出キットにおいて、TRIzol で最も高濃度な RNA が抽出された。RNA 濃度の中央値を赤い線で示す。

* : p 値 < 0.02, ** : p 値 < 0.01

TRIzol : TRIzol LS Reagent, MoBio : RNeasy PowerMicrobiome Kit,
 MagMAX : MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Kit, Zymo : Quick-
 RNA Miniprep Kit

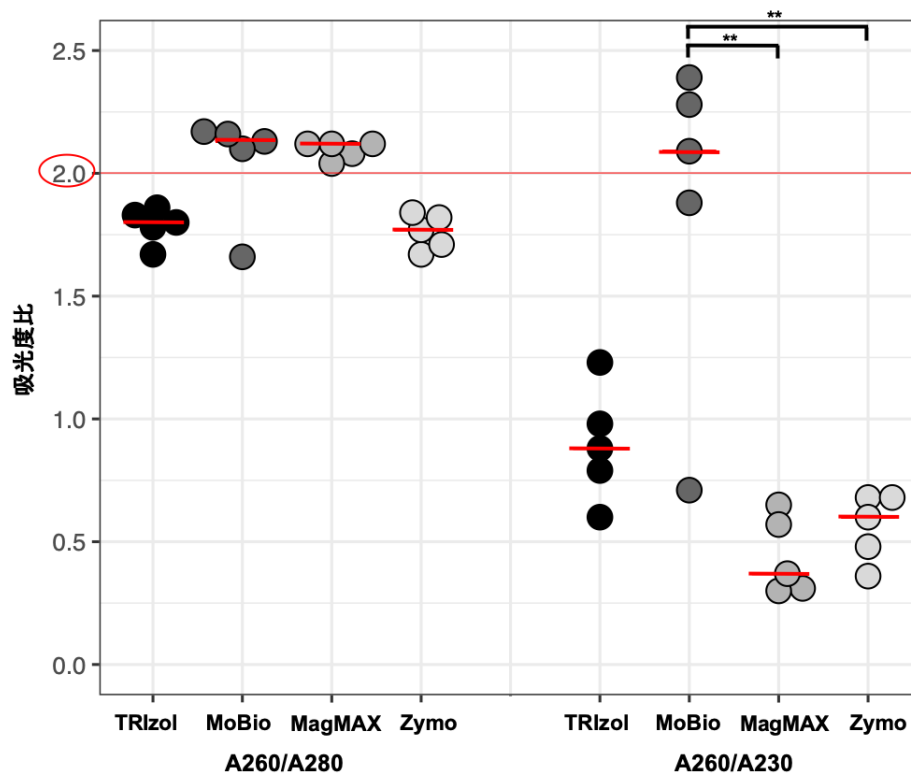


図 4. RNA 抽出キット別のイヌ糞便検体から抽出した RNA の純度の比較

4 種類の RNA 抽出キットにおいて、MoBio はタンパク質の混入が少ないだけでなく、最も有機化合物などの残留が少なく、高純度な RNA を抽出した。RNA の純度の中央値を赤い線で示す。

** : p 値 < 0.01

TRIzol : TRIzol LS Reagent, MoBio : RNeasy PowerMicrobiome Kit,
 MagMAX : MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Kit, Zymo : Quick-RNA
 Miniprep Kit

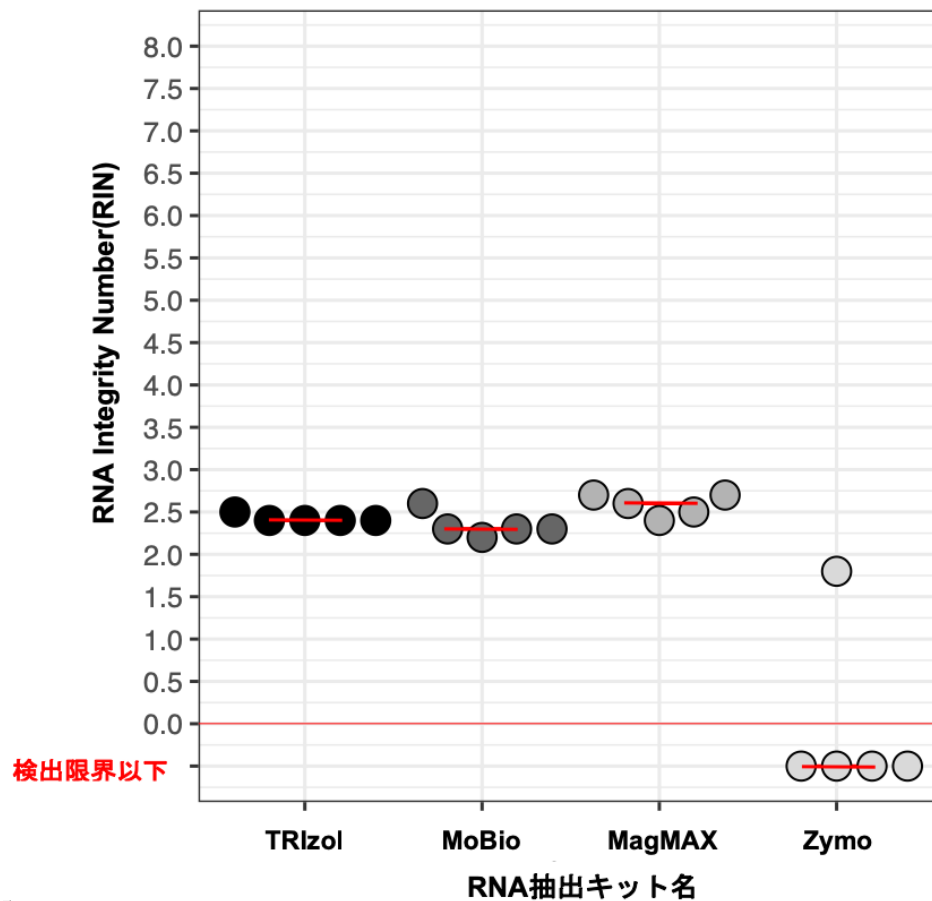


図 5. RNA 抽出キット別のイヌ糞便検体から抽出した RNA の RIN の比較

RIN の結果より 4 種類の RNA 抽出キットにおいて抽出した RNA の RIN は、いずれも低値であった。RIN の中央値を赤い線で示す。

TRIZol : TRIzol LS Reagent, MoBio : RNeasy PowerMicrobiome Kit, MagMAX : MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Kit, Zymo : Quick-RNA Miniprep Kit

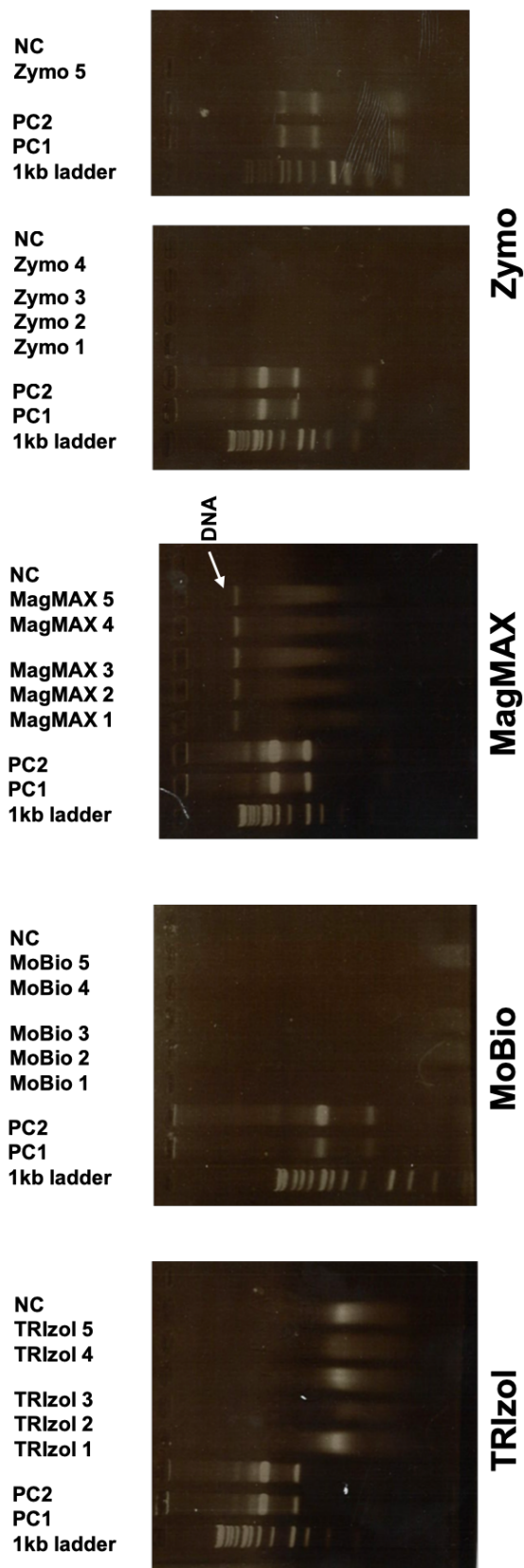


図 6. 電気泳動による RNA 抽出キット別のイヌ糞便検体から抽出した RNA の品質の比較

いずれの RNA 抽出キットにおいても、抽出した RNA のバンドは確認できなかった。

PC1・2：ヒト由来の細胞株から抽出された RNA, NC：各 RNA 抽出キットを用いて糞便検体の代わりに各 RNA 溶出緩衝液から抽出した抽出液, TRIzol：TRIzol LS Reagent,

MoBio：RNeasy PowerMicrobiome Kit, MagMAX：MagMAX Total Nucleic Acid

Isolation Kit, Zymo：Quick-RNA Miniprep Kit

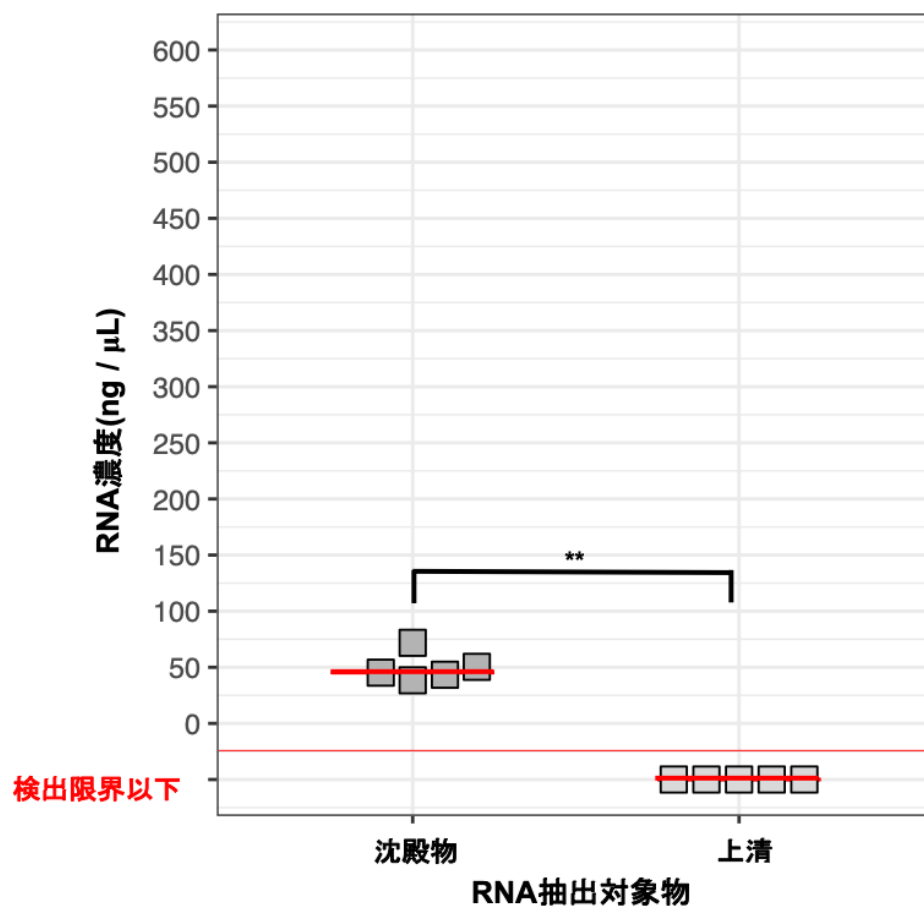


図 7. 抽出対象別の RNAlater を用いて保存したイヌ糞便検体の RNA 濃度の比較

RNAlater に保存され、沈殿物から抽出した RNA においては、RNAlater に保存され、上清から抽出した RNA と比べて高濃度な RNA を抽出した。上清から抽出した RNA においては、全 5 標本中 5 標本で RNA 濃度が検出限界以下であった。

** : p 値 < 0.01

RNAlater : RNAlater Stabilization Solution

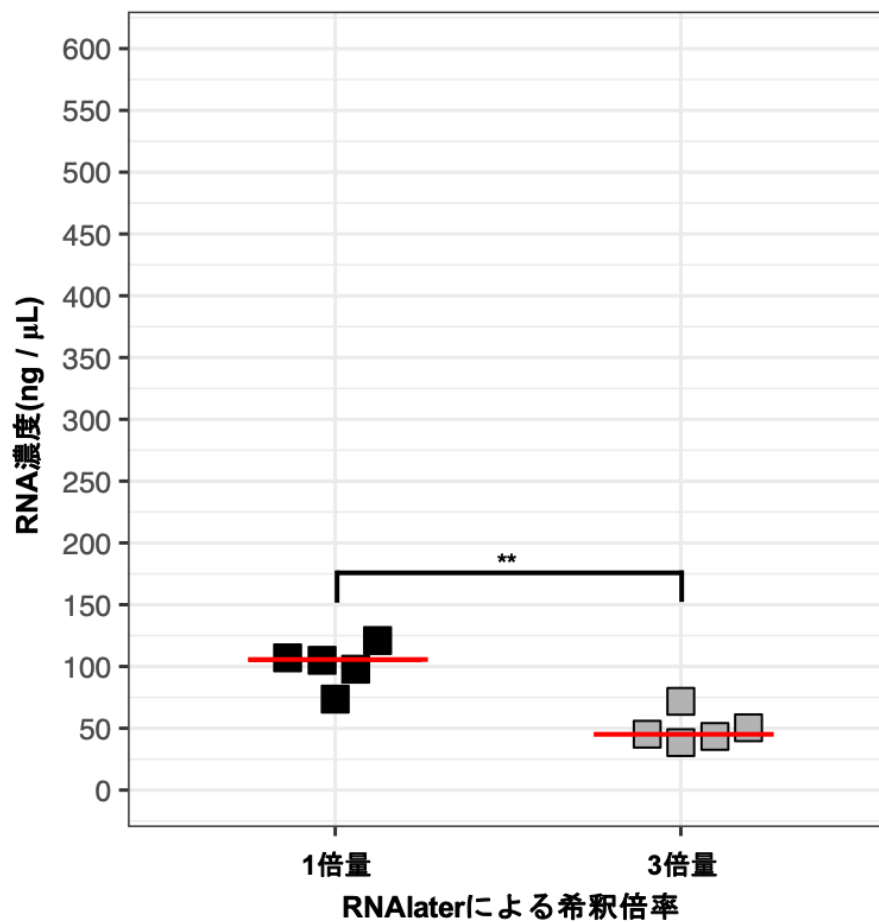


図 8. RNAlater による希釈倍率別のイヌ糞便検体の RNA 濃度の比較

1 倍量の希釈倍率の RNeasy 保存液に保存され、抽出した RNA においては、3 倍量の希釈倍率に対して約 2 倍以上の RNA 濃度であった。RNA の濃度の中央値を赤い線で示す。

** : p 值 < 0.01

RNAlater : RNAlater Stabilization Solution

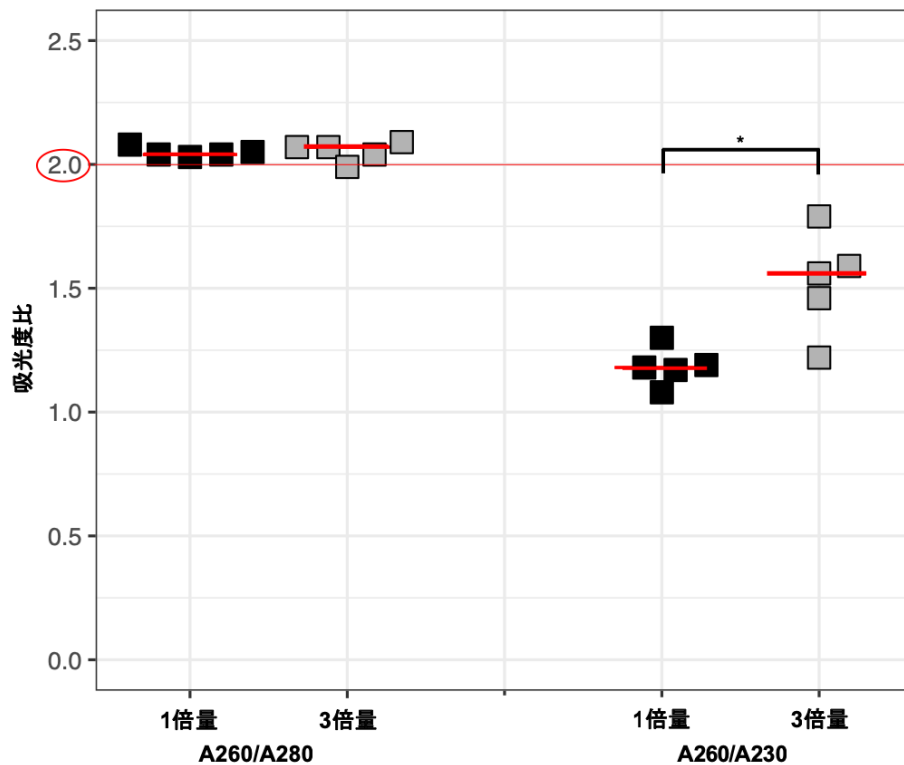


図 9. RNAlater による希釈倍率別のイヌ糞便検体の RNA 純度の比較

1 倍量の希釈倍率および 3 倍量の希釈倍率の RNAlater に保存され、抽出した RNA において、いずれもタンパク質の混入は認められなかった。一方で有機化合物などの残留は 1 倍量の希釈倍率および 3 倍量の希釈倍率でいずれも認められ、3 倍量の希釈倍率では比較的著しい汚染が認められた。RNA 純度の中央値を赤い線で示す。

* : p 値 < 0.02

RNAlater : RNAlater Stabilization Solution

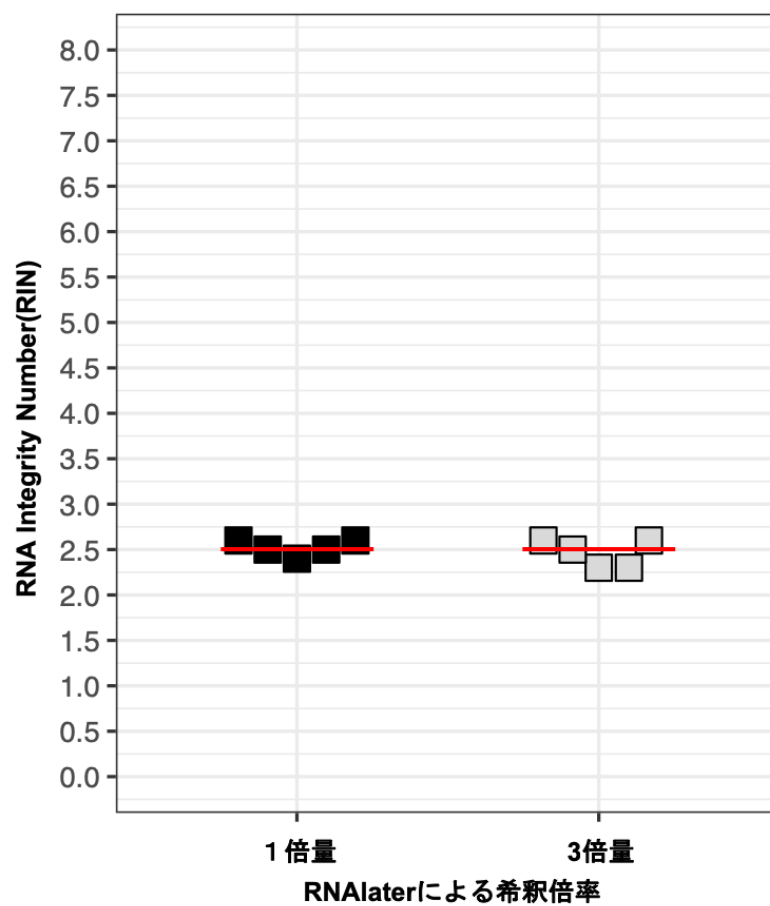


図 10. RNAlater によるイヌ糞便検体の希釈濃度の違いによる RIN の比較

1 倍量の希釈倍率および 3 倍量の希釈倍率の RNAlater に保存され、抽出した RNA の RIN は、いずれも低値であった。RIN の中央値を赤い線で示す。

RNAlater : RNAlater Stabilization Solution

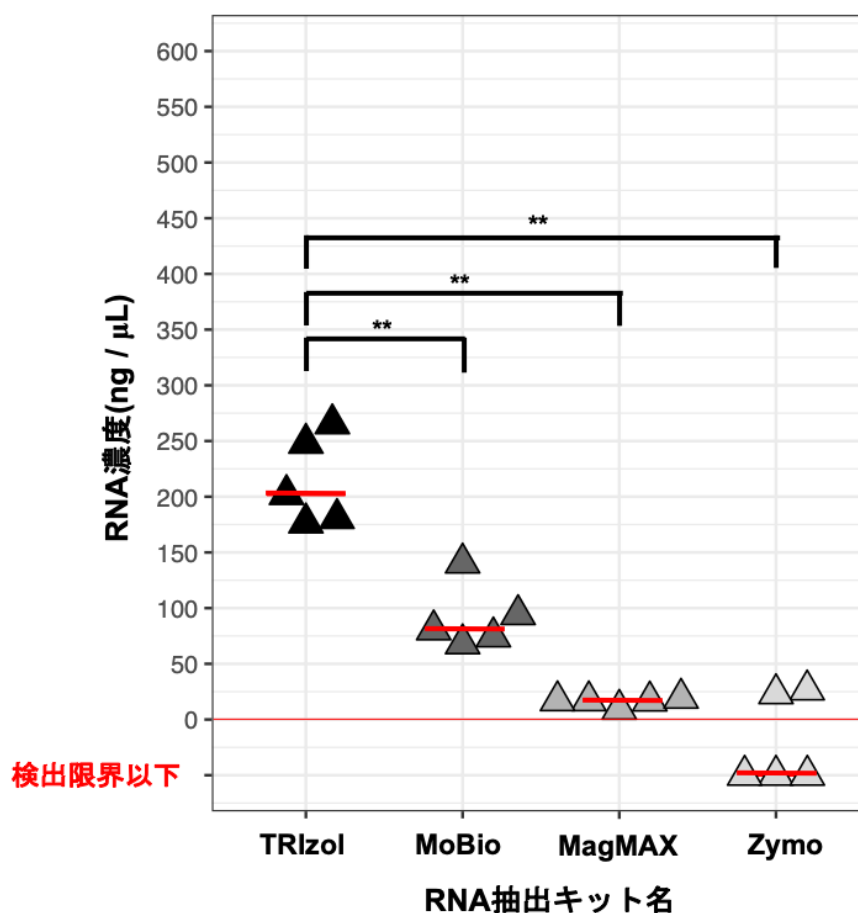


図 11. RNA 抽出キット別の FTA card を用いて保存されたイヌ糞便検体の RNA の濃度の比較

4 種類の RNA 抽出キットのうち、TRIzol により抽出した RNA が最も高濃度であった。Zymo で抽出した 5 標本中 3 標本の RNA の濃度は、検出限界以下であった。RNA 濃度の中央値を赤い線で示す。

** : p 値 < 0.01

FTA card : FTA Classic Card, TRIzol : TRIzol LS Reagent,
 MoBio : RNeasy PowerMicrobiome Kit, MagMAX : MagMAX Total
 Nucleic Acid Isolation Kit, Zymo : Quick-RNA Miniprep Kit

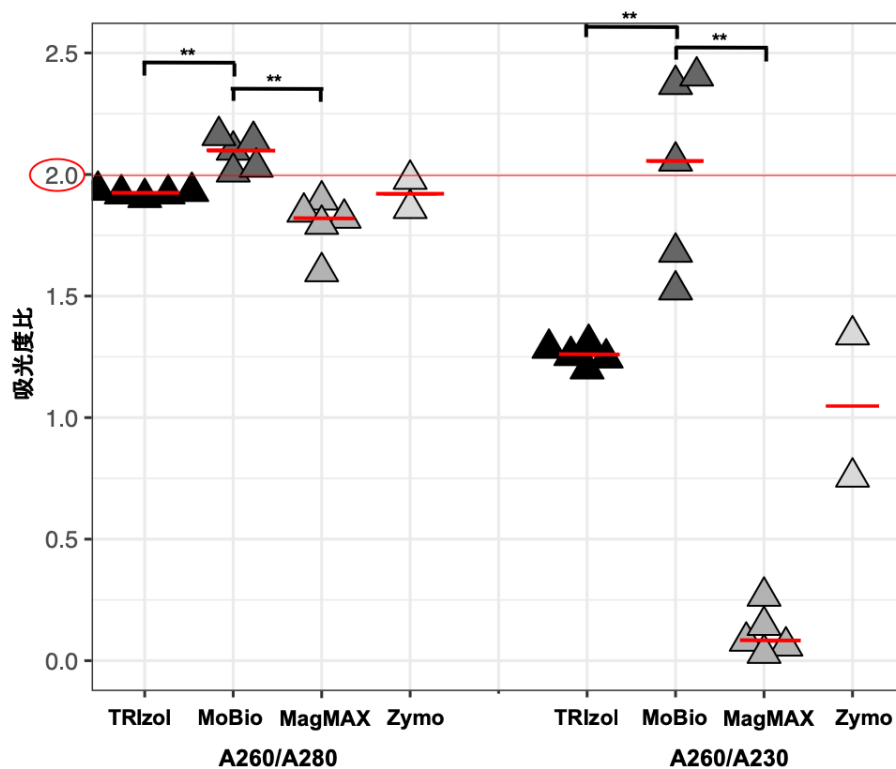


図 12. RNA 抽出キット別の FTA card を用いて保存されたイヌ糞便検体の RNA の純度の比較

4 種類の RNA 抽出キットのうち、MoBio ではタンパク質の混入が少ないだけでなく、最も有機化合物などの残留が少なく高純度な RNA が抽出された。RNA 純度の中央値を赤い線で示す。Zymo において検出限界以下の RNA 濃度であった 3 標本は、RNA そのものの純度を反映していないとして、RNA 純度を評価しなかった。

** : p 値 < 0.01

FTA card : FTA Classic Card, TRIzol : TRIzol LS Reagent, MoBio : RNeasy PowerMicrobiome Kit, MagMAX : MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Kit, Zymo : Quick-RNA Miniprep Kit

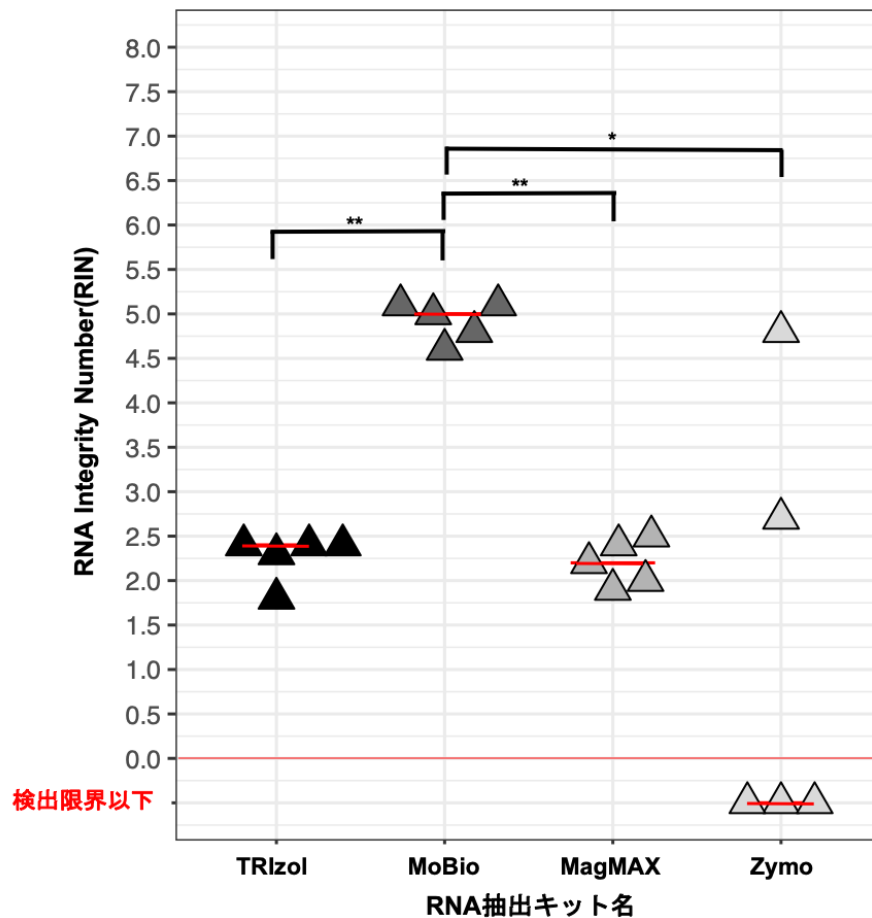


図 13. FTA card 内に保存されたイヌ糞便検体を用いた各 RNA 抽出キットにおける RNA の RIN の比較

MoBio の 5 標本および Zymo の 1 標本においては高い RIN を認めた。しかし、Zymo の 5 標本中 3 標本は RNA 濃度が RIN の算出限界以下の濃度であったため、RIN の算出ができなかった。RIN の中央値を赤い線で示す。

* : p 値 < 0.02, ** : p 値 < 0.01

FTA card : FTA Classic Card, TRIzol : TRIzol LS Reagent, MoBio : RNeasy PowerMicrobiome Kit, MagMAX : MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Kit, Zymo : Quick-RNA Miniprep Kit

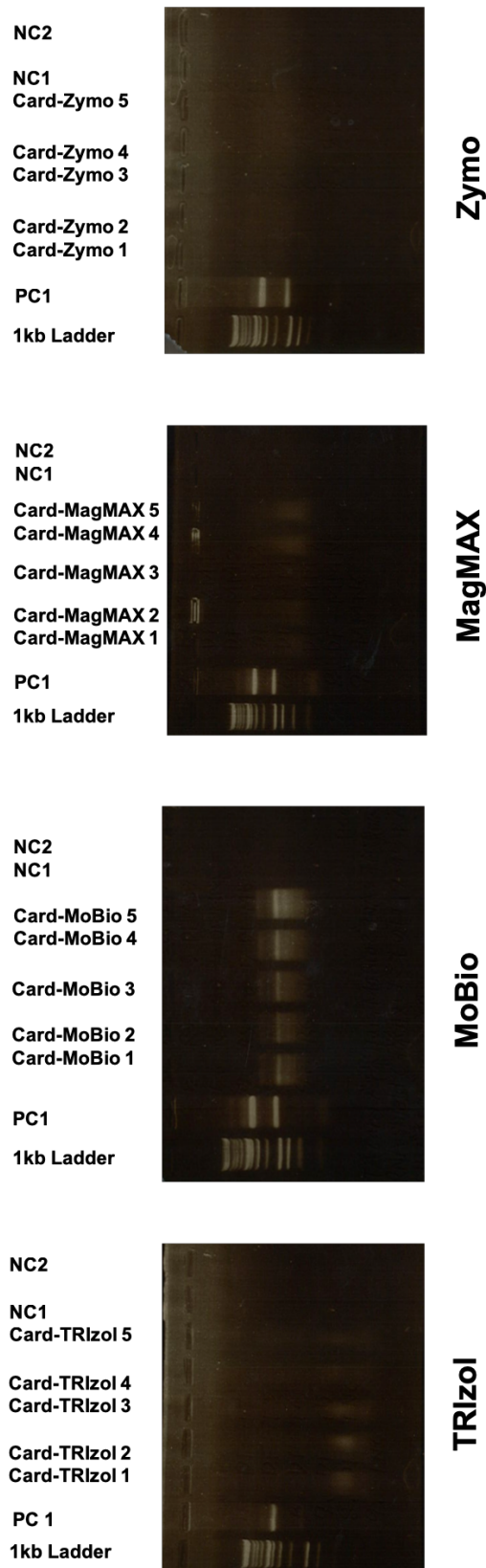


図 14. 電気泳動による RNA 抽出キット別のイヌ糞便検体の RNA の品質の比較

MoBio で抽出した RNA において 2 本のバンドを確認した。しかし確認された 2 本のバンドは、陽性コントロールのバンドの位置よりも低い位置であった。一方、他の 3 種類の RNA 抽出キットにおいて は、明確なバンドは確認できず、陽性コントロール付近にスメア状のブロードバンドを確認した。

PC1・2：ヒト由来の細胞株から抽出された RNA，NC1：糞便検体の代わりに何も塗布していない FTA card から抽出された抽出液，NC2：糞便検体の代わりに UltraPure DNase / RNase-Free Distilled Water から抽出された抽出液，FTA card：FTA Classic Card，TRIzol：TRIzol LS Reagent，MoBio：RNeasy PowerMicrobiome Kit，MagMAX：MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Kit，Zymo：Quick-RNA Miniprep Kit

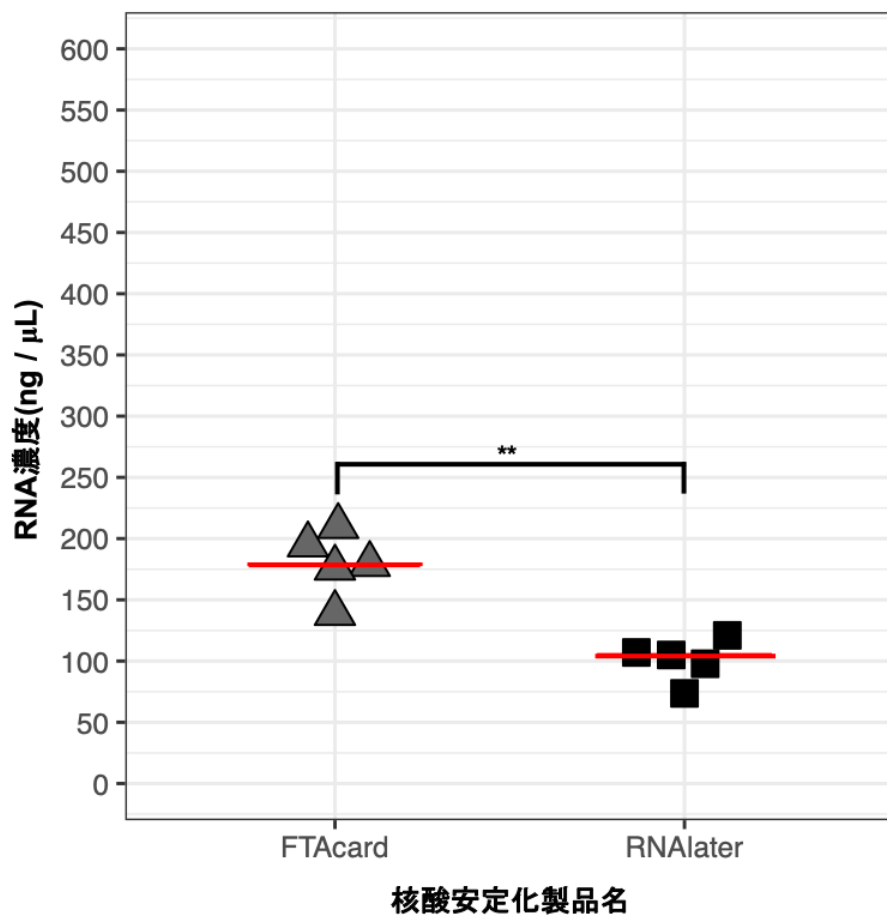


図 15. FTA card および RNAlater を用いた保存方法別のイヌ糞便検体の RNA 濃度の比較

RNAlater から抽出した RNA に比べ、FTA card から抽出した RNA は高濃度であった。RNA の濃度の中央値を赤い線で示す。

** : p 値 < 0.01

FTA card : FTA Classic Card, RNAlater : RNAlater Stabilization Solution

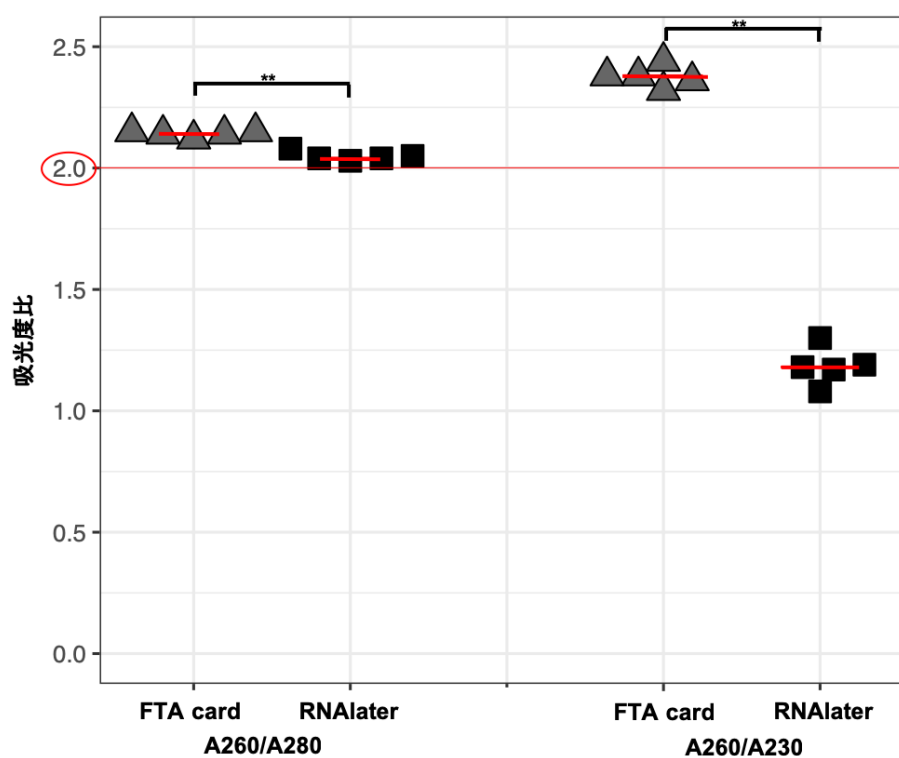


図 16. FTA card および RNAlater を用いた保存方法別のイヌ糞便検体の RNA 純度の比較

タンパク質の混入は FTA card から抽出した RNA および RNAlater から抽出した RNA のどちらにも認められなかった。一方で、有機化合物などの残留は RNAlater で認められたものの、FTAcad では認められなかった。RNA の純度の中央値を赤い線で示す。

** : p 値 < 0.01

FTAcad : FTA Classic Card, RNAlater : RNAlater Stabilization Solution

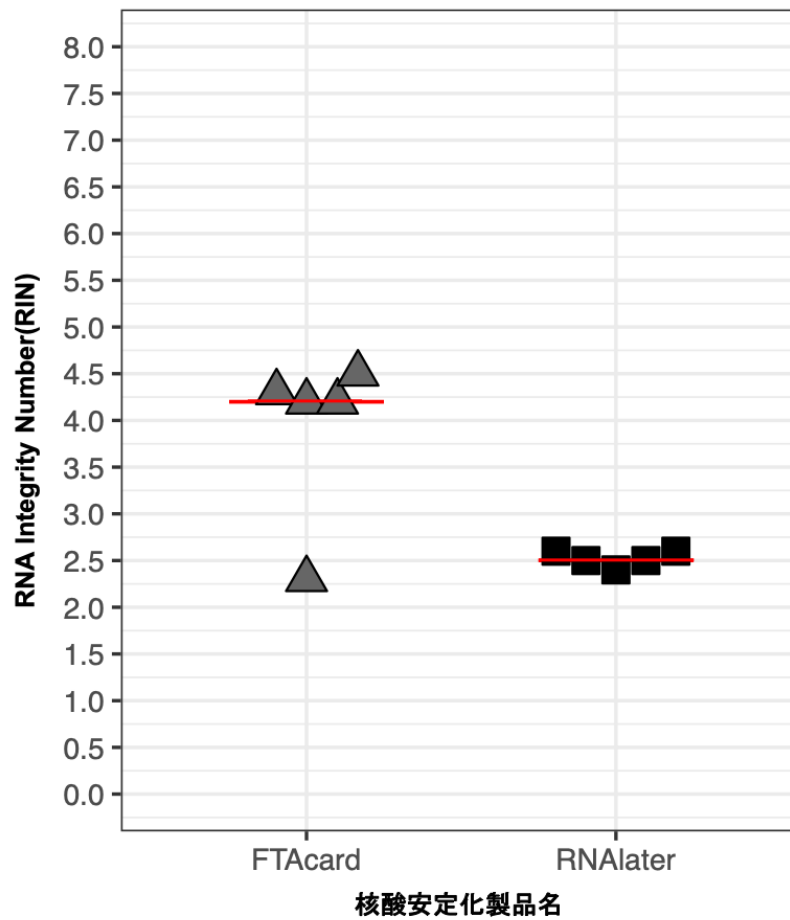


図 17. FTA card および RNAlater による保存方法別のイヌ糞便検体の RIN の比較

FTA card から抽出した RNA では RNAlater から抽出した RNA に比べて、より高い RIN を示していた。RIN の中央値を赤い線で示す。

FTA card : FTA Classic Card, RNAlater : RNAlater Stabilization Solution

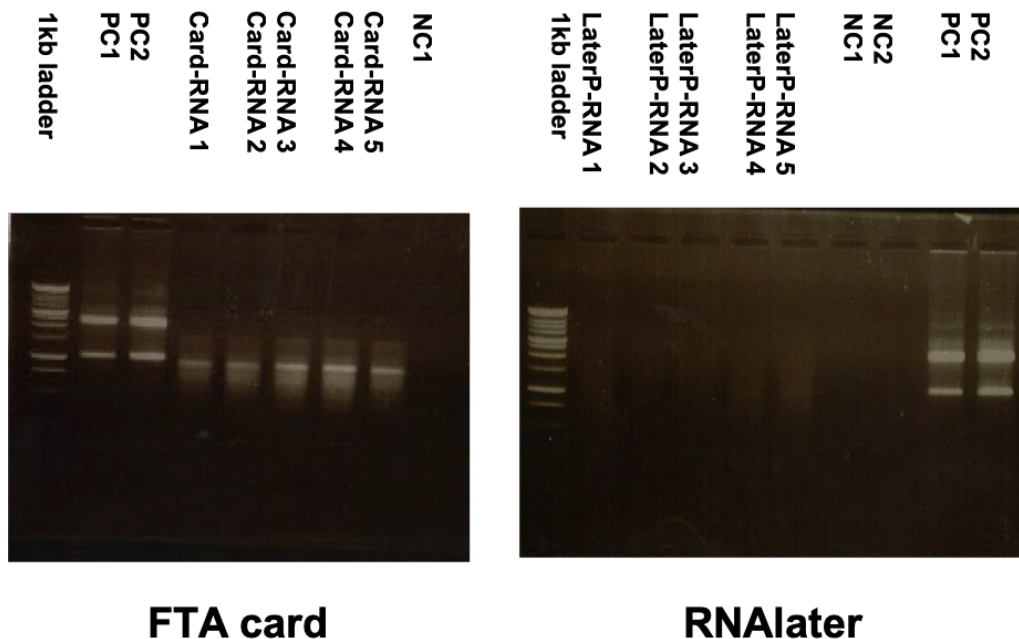


図 18. 電気泳動による FTA card および RNAlater における保存方法別のイヌ糞便検体の RNA の品質の比較

FTA card から抽出した RNA においてのみ 2 本のバンドを確認した。しかし確認された 2 本のバンドは、陽性コントロールのバンドの位置よりも低い位置であった。一方 RNAlater から抽出した RNA においては、明確なバンドは確認できず、陽性コントロール付近にスメア状のブロードバンドを確認した。

NC1 : 糞便検体の代わりに UltraPure DNase / RNase-Free Distilled Water から抽出された抽出液, NC2 : 糞便検体の代わりに RNAlater から抽出された抽出液, PC1・2 : ヒト由来の細胞株から抽出された RNA, FTA card : FTA Classic Card, RNAlater : RNAlater Stabilization Solution

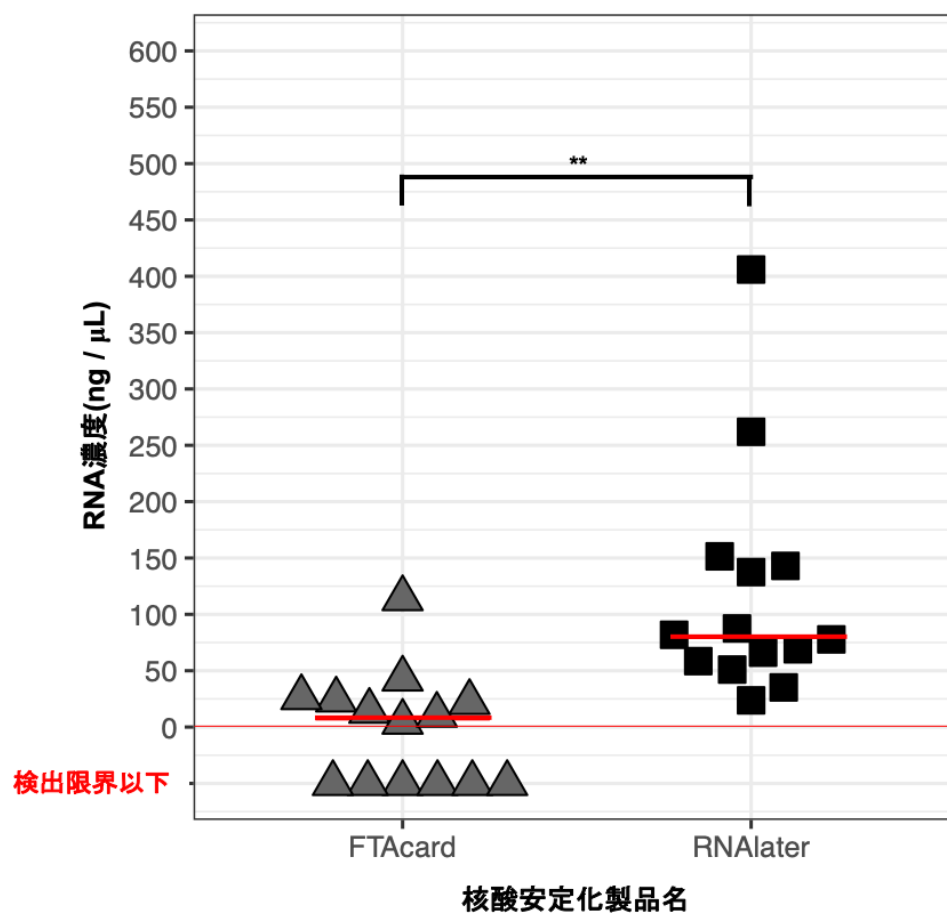


図 19. FTA card および RNAlater を用いた保存方法別のヒト糞便検体の RNA 濃度の比較

FTA card から抽出した RNA においては、14 検体中 6 検体で RNA の濃度が検出限界以下であった。FTA card に比べて、RNAlater から抽出した RNA は比較的高濃度であった。RNA 濃度の中央値を赤い線で示す。

** : p 値 < 0.01

FTA card : FTA Classic Card, RNAlater : RNAlater Stabilization Solution

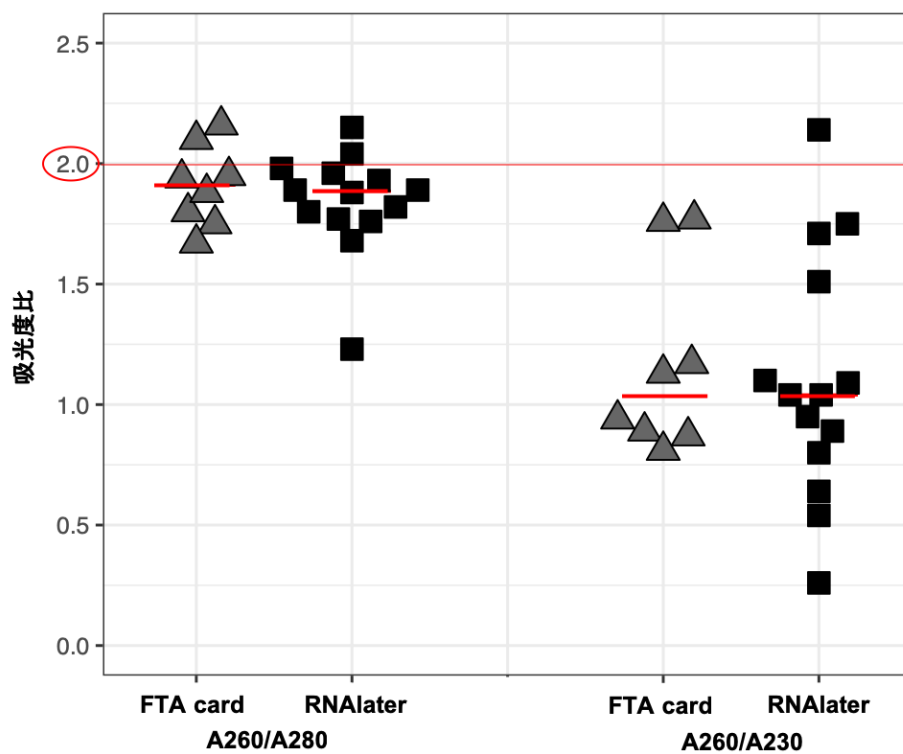


図 20. FTA card および RNAlater を用いた保存方法別のヒト糞便検体の RNA 純度の比較

タンパク質の混入および有機化合物などの残留は、RNAlater および FTA card で共に認められた。RNA 純度の中央値を赤い線で示す。FTA card において検出限界以下の RNA 濃度であった 6 検体は、RNA そのものの純度を反映していないとして、RNA 純度を評価しなかった。

FTA card : FTA Classic Card, RNAlater : RNAlater Stabilization Solution

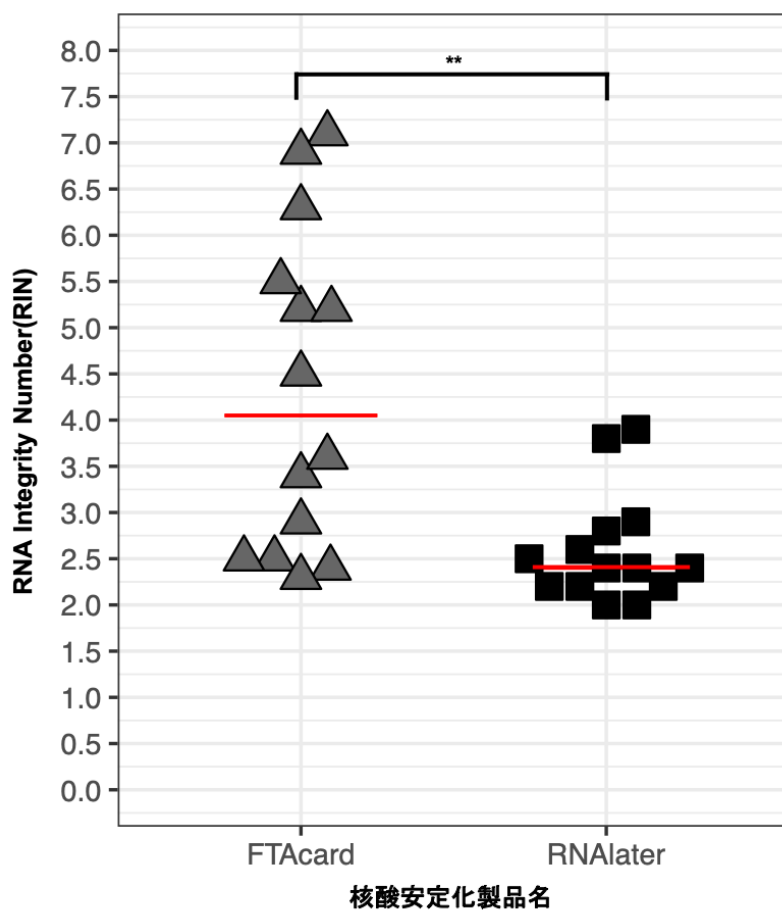


図 21. FTA card および RNAlater を用いた保存方法別のヒトの糞便検体の RIN の比較

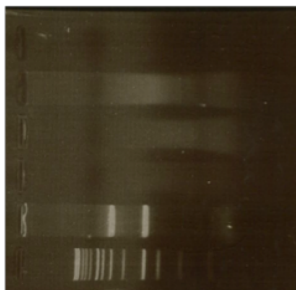
中央値が 2.4、最高値が 3.9 と低い RNAlater から抽出した RNA に対して、FTA card から抽出した RNA においては中央値が 4.1、最高値が 7.1 と比較的高い RIN を保持していた。RIN の中央値を赤い線で示す。

** : p 値 < 0.01

FTA card : FTA Classic Card, RNAlater : RNAlater Stabilization

NC
2MS20C-R ○
2MS19C-R ○
2MS18C-R ○

PC
1kb ladder



NC
2MS17C-R ○
2MS17C-F ●
2MS16C-R ○

2MS16C-F ●
2MS15C-R ○
2MS15C-F ●

2MS14C-R ○
2MS13C-R ○
2MS12C-R ○

PC
1kb ladder

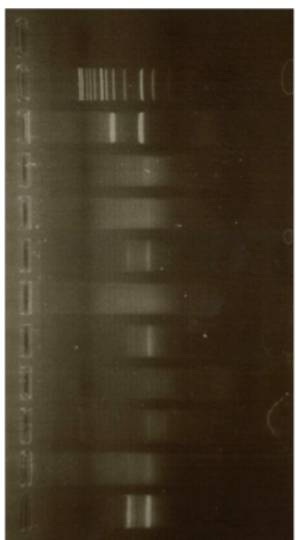


NC
1kb ladder
PC

2MS11C-R ○
2MS10C-R ○
2MS10C-F ●

2MS09C-R ○
2MS09C-F ●
2MS08C-R ○

2MS08C-F ●
2MS06C-R ○
2MS06C-F ●



● : FTA card
○ : RNAlater

図 22. 電気泳動による FTA card および RNAlater を用いた保存方法別のヒト糞便検体の RNA の品質の比較

FTA card から抽出した RNA において 7 検体中 4 検体 (2MS06C-F, 2MS09C-F, 2MS10C-F, 2MS17C-F) で 2 本のバンドを確認した。一方 RNAlater から抽出した RNA においては、14 検体中 1 検体 (2MS06C-R) で 2 本のバンドを確認した。しかし確認された 2 本のバンドは、陽性コントロールのバンドの位置よりも低い位置であった。

2MS06-20C-R : RNAlater に保存された乳児の糞便検体から抽出した RNA, 2MS06-17C-F : FTA card に保存された乳児の糞便検体から抽出した RNA, PC : ヒト由来の細胞株から抽出された RNA, NC : 糞便検体の代わりに UltraPure DNase / RNase-Free Distilled Water から抽出された溶出液, FTA card : FTA Classic

Card, RNAlater : RNAlater Stabilization Solution

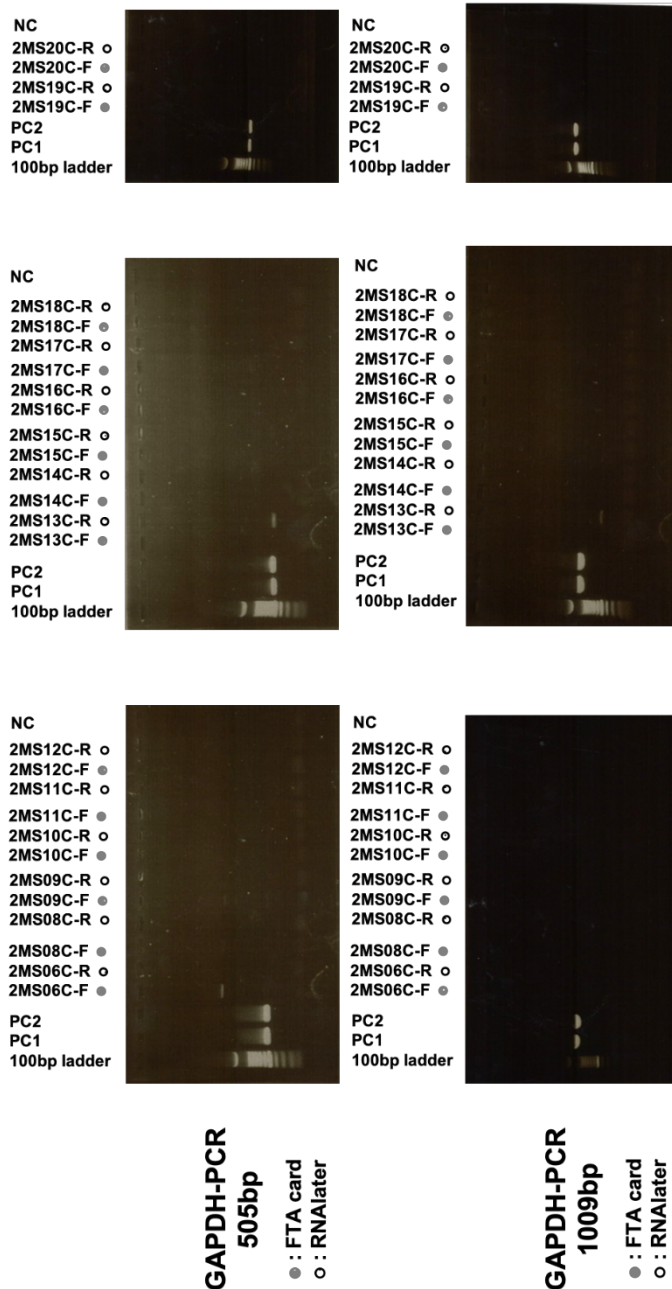


図 23. GAPDH-PCR (505bp・1009bp) によるヒト由来遺伝子の存在確認

RNAlater から抽出した RNA である 2MS13C-R においてのみ 505 bp の GAPDH に特異的なバンドを検出した。

2MS06-20C-R : RNAlater に保存された乳児の糞便検体から抽出した RNA, 2MS06-20C-F : FTA card に保存された乳児の糞便検体から抽出した RNA, PC1 : 糞便検体から抽出され、合成された cDNA の代わりにヒト由来の細胞株から抽出された RNA を使用して cDNA を合成後、GAPDH-PCR を行った陽性コントロール, PC2 : 糞便検体から抽出された RNA の代わりにヒト由来の細胞株から抽出された RNA を用いて合成された cDNA を使用して、サンプルと共に GAPDH-PCR を行った陽性コントロール, NC : 滅菌 Milli-Q 水

表 1. 各 RNA 抽出キットの構成要素の比較

RNA抽出キット名	TRIzol	MoBio	MagMAX	Zymo
溶液名	Chemical lysis buffer	TRIzol LS Reagent	Lysis Binding Concentrate	RNA Lysis Buffer
	Inhibitor removal solution	クロロホルム		
	Binding Solution	-	-	-
	Binding Beads	100% イソプロパノール	100% イソプロパノール	-
	Wash Solution	-	Nucleic Acid Binding Beads	-
	DNase	75% エタノール	Wash solution 1	RNA Wash Buffer
	DNase digestion buffer	-	Wash solution 2	
	DNase stop solution	-	-	DNase I
	Elution Buffer	Ultra Pure Water	Elution Buffer	DNase digestion buffer
				RNA Prep Buffer
チューブ名	Bead tube	-	Zirconia beads	DNase/RNase free water
	Filter tube	-	Silica Spin Filter Tubes	Spin-Away Filter (yellow)
				Zymo-Spin IIICG Column (green)

各 RNA 抽出キットの構成要素を比較すると、MoBio のみ Inhibitor removal solution (阻害剤除去溶液) が含まれている。TRIzol および MagMAX は、DNase が RNA 抽出キット内に含まれていないため、別途 TURBO DNA-free Kit を DNase 処理に使用した。

TRIzol : TRIzol LS Reagent, MoBio : RNeasy PowerMicrobiome Kit, MagMAX : MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Kit, Zymo : Quick-RNA Miniprep Kit